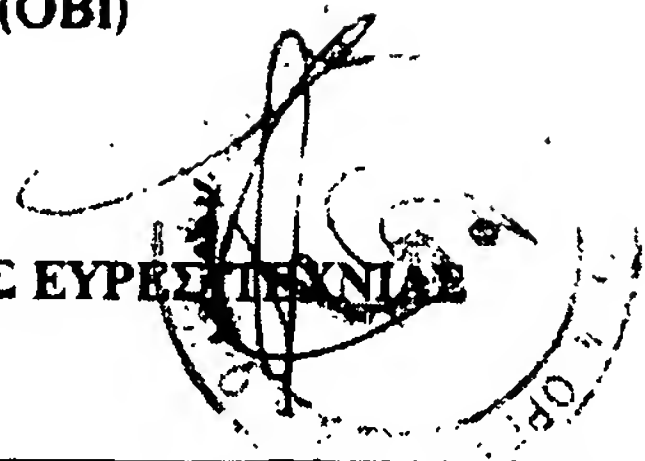




ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

## ΑΙΤΗΣΗ

ΓΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΗΣ ΤΕΧΝΙΑΣ



Αριθμός αιτήσεως για καταβολή	980402483
Αριθμός αιτήσεως Ευρωπαϊκού Διπλώματος	
Ημερομηνία παραλαβής:	22.10.1998
Ημερομηνία καταβολής της μεταφράσεως Ευρωπαϊκού Διπλώματος	
Αριθμός δημοσίευσής Ε.Δ.Β.Ι.	

Αριθμός / ημερομηνία κατάθεσης Ευρωπαϊκής αίτησης:	91916986.2	-	13.09.91
Αριθμός / ημερομηνία δημοσίευσής χορήγησης Ευρωπαϊκού Διπλώματος	0548228	-	12.08.98

<input checked="" type="checkbox"/> Μετάφραση Ευρωπαϊκού Διπλώματος	<input type="checkbox"/> Μετάφραση τροποποιημένου Ευρωπαϊκού Διπλώματος
--	--

ΔΙΕΘΝΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ:	Χώρες προσδιορισμού
C12N 9/20	AT <input checked="" type="checkbox"/> Αυστρία ES <input checked="" type="checkbox"/> Ισπανία IE <input type="checkbox"/> Ιρλανδία PT <input type="checkbox"/> Πορτογαλία
	BE <input checked="" type="checkbox"/> Βέλγιο FR <input checked="" type="checkbox"/> Γαλλία IT <input checked="" type="checkbox"/> Ιταλία SE <input checked="" type="checkbox"/> Σουηδία
	LI-CH <input checked="" type="checkbox"/> Ελβετία Λιχτενστάιν FL <input type="checkbox"/> Φιλανδία LU <input checked="" type="checkbox"/> Λουξεμβούργο
	DE <input checked="" type="checkbox"/> Γερμανία GB <input checked="" type="checkbox"/> Μ. Βρετανία MC <input type="checkbox"/> Μονακό
	DK <input checked="" type="checkbox"/> Δανία GR <input checked="" type="checkbox"/> Ελλάδα NL <input checked="" type="checkbox"/> Ολλανδία

ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΑΙΤΗΣΗΣ. ΠΤΛΟΣ
------------------------------

ΚΑΤΑΘΕΤΗΣ	NOVO NORDISK A/S
Όνομα / Επωνυμία:	NOVO ALLE, 2880 BAGSVAERD, ΔΑΝΙΑ
Διεύθυνση :/ Έδρα:	
Τηλέφωνο:	Τέλεφαξ:

<input type="checkbox"/> Επιπλέον καταθέτες σε πρόσθετο φύλλο χαρτί (Αριθμός)
--

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ (ΕΣ)

Όνομα:

SVENDSEN, ALLAN

Διεύθυνση:

BAKKELEDET 28, DK-3460 BIRKEROD, ΔΑΝΙΑ

Τηλέφωνο:

Τέλεφαξ:

03

Επιπλέον εφευρέτες σε πρόσθετο φύλλο χαρτιού  
(Αριθμός)

ΔΗΛΩΣΗ ΠΡΟΤΕΡΑΙΟΤΗΤΑΣ (αριθμός - ημερομηνία - χώρα προέλευσης)

219490 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ  
219590 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ  
219690 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ

ΠΑΗΡΕΞΟΥΣΙΟΣ

Όνομα:

ΘΕΟΔΩΡΑ ΒΑΓΕΝΑ

Διεύθυνση:

Κουμπάρη 2, 106 74 Αθήνα

Τηλέφωνο:

Τέλεφαξ:

3625757 - 3626624 - 3622724

3626742

ΑΝΤΙΚΛΗΤΟΣ

Όνομα:

ΕΛΕΝΗ Γ. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

Διεύθυνση:

Κουμπάρη 2, 106 74 Αθήνα

Τηλέφωνο:

3625757 - 3626624 - 3622724

3626742

Τόπος:

Αθήνα

Ημερομηνία:

21.10.98

Υπογραφή (ές) του (των) καταθέτη (τών) ή του (των) πληρεξουσίου (ων)

ΒΑΓΕΝΑ ΘΕΟΔΩΡΑ  
ΔΙΚΗΓΟΡΟΣ Α.Μ. 19668  
ΚΟΥΜΠΑΡΗ 2, Α.Π.Α.  
ΤΗΛ: 3625757 - 3626624  
ΑΦΜ: 54981583  
ΔΟΥ: ΒΥΡΩΝΑ

ΘΕΟΔΩΡΑ ΒΑΓΕΝΑ

ΠΑΡΑΚΑΛΟΥΜΕΝΑ ΔΑΚΤΥΛΟΓΡΑΦΗΣΕΤΕ ΤΟ ΟΝΟΜΑ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΓΡΑΦΗ.  
ΣΕ ΠΕΡΙΓΡΩΣΗ ΝΟΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΟΥ ΝΑ ΔΑΚΤΥΛΟΓΡΑΦΗΘΕΙ ΚΑΙ Η ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ  
ΥΠΟΓΡΑΦΟΝΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΓΓΡΕΛΑ



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

E

## ΑΙΤΗΣΗ

ΓΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ

(έντυπο για επιπλέον εφευρέτες)

Αριθμός αίτησης για καταθεση μεταφράσης Ευρωπαϊκού Διπλώματος:	980402483	01
Ημερομηνία παραλαβής:	22.10.1998	
Ημερομηνία κατάθεσης της μεταφράσης Ευρωπαϊκού Διπλώματος:		
Αριθμός δημοσίευσης / Ε.Δ.Β.Ι.		

Αριθμός / ημερομηνία κατάθεσης Ευρωπαϊκής αίτησης:	91916986.2	-13.09.91	02
Αριθμός / ημερομηνία δημοσίευσης χορήγησης Ευρωπαϊκού Διπλώματος:	0548228	-12.08.98	

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:			08
Όνομα / Επωνυμία:	CLAUSEN, IB, GROTH		
Διεύθυνση / Έδρα:	ORDRUP JAGTVEJ 153, ST.TV., DK-2920 CHARLOTTENLUND, ΔΑΝΙΑ		
Τηλέφωνο:		Τέλεφαξ:	

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:			08
Όνομα / Επωνυμία:	PATKAR, SHAMKANT, ANANT		
Διεύθυνση / Έδρα:	CHRISTOFFERS ALLE 91, DK-2800 LYNGBY, ΔΑΝΙΑ		
Τηλέφωνο:		Τέλεφαξ:	


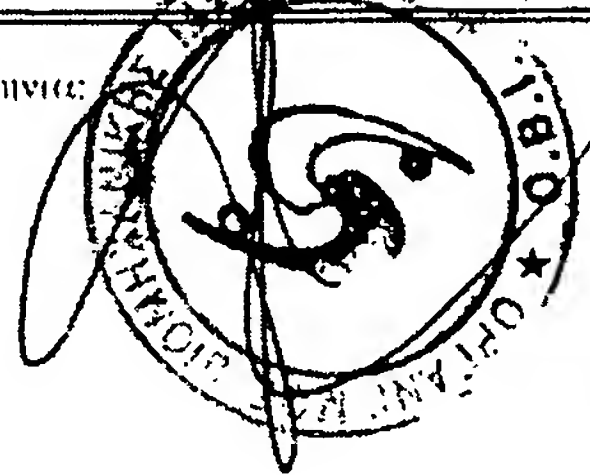
ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:			08
Όνομα / Επωνυμία:	GORMSEN, ERIK		
Διεύθυνση / Έδρα:	SNEKKETOFTEN 15, DK-2830 VIRUM, ΔΑΝΙΑ		
Τηλέφωνο:		Τέλεφαξ:	

<input type="checkbox"/> Επιπλέον καταθέτες σε πρόσθετο φύλλο χαρτί	09
(Αριθμός)	



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

## ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΕΓΓΡΑΦΩΝ

ΔΙΚΑΙΟΥΧΟΣ Ή ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΣ	Ημερομηνία:
	
	Υπογραφή / επισημη σφραγίδα

Αριθμός αίτησης για κατάθεση μεταφράσεως Ευρωπαϊκού Διπλώματος:	980402483
Ημερομηνία παραλαβής:	02.10.1998
Ημερομηνία κατάθεσης της μεταφράσεως Ευρωπαϊκού Διπλώματος:	
Αριθμός δημοσίευσής ΕΔΒΙ:	

Πιστοποιούμε την παραλαβή των εγγράφων έτσι όπως δηλώνονται παρακάτω:

Η ΑΙΤΗΣΗ ΟΠΩΣ ΚΑΤΑΤΙΘΕΤΑΙ ΣΥΝΟΔΕΥΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΕΓΓΡΑΦΑ:

- ☒ 1. Μετάφραση της Περιγραφής ☒ 2 αντίγραφα ☒ 4 φύλλα ανά αντίγραφο
- ☒ 1α. Ξενόγλωσση Περιγραφή στα: ☒ Αγγλικά ☐ Γαλλικά ☐ Γερμανικά - ☐ αντίγραφα ☒ 21 φύλλα ανά αντίγραφο
- ☒ 2. Μετάφραση των Αξιώσεων: ☒ 2 αντίγραφα ☐ 3 φύλλα ανά αντίγραφο
- ☒ 2α. Ξενόγλωσσες Αξιώσεις στα: ☒ Αγγλικά ☐ Γαλλικά ☐ Γερμανικά - ☐ αντίγραφα ☒ 2 φύλλα ανά αντίγραφο
- ☒ 3. Μετάφραση της Περίληψης: ☒ 2 αντίγραφα ☐ 1 φύλλα ανά αντίγραφο
- ☒ 3α. Ξενόγλωσση Περίληψη στα: ☒ Αγγλικά ☐ Γαλλικά ☐ Γερμανικά - ☐ αντίγραφα ☒ 2 φύλλα ανά αντίγραφο
- ☒ 4. Σχέδια: ☒ 2 αντίγραφα ☐ 9 φύλλα ☒ 9 σύνολο σχεδίων
- ☒ 4α. Ξενόγλωσσα σχέδια: ☐ αντίγραφα ☐ 9 φύλλα ☒ 9 σύνολο σχεδίων
- ☐ 5. Διαφορετικές αξιώσεις για την Ελλάδα
- ☒ 6. Απόδειξη καταβολής τέλους κατάθεσης
- ☒ 7. Ειδικό πληρεξούσιο
- ☒ 8. Γενικό Πληρεξούσιο με ~~χωρίς~~ μετάφραση
- ☐ 9. Επιπλέον φύλλο (α) καταθέτη (ών)
- ☒ 10. Επιπλέον φύλλο (α) εφευρέτη (ών)
- ☒ 11. Έντυπο Α<sub>1</sub> ☒ ή Α<sub>2</sub> ☐ ή Α<sub>3</sub> ☐
- ☐ 12. Έντυπο Β<sub>1</sub> ☐ ή Β<sub>2</sub> ☐
- ☒ 13. Έντυπο 2006 ☐
- ☒ 14. ΕΡΟ FORM 1219 ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕ ΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠ.  
Δ.Ε.

EP 15153

## ΤΙΤΛΟΣ

5

Παραλλαγές λιπάσης

### Πεδίο της εφεύρεσης

10 Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται σε νέες παραλλαγές ενζύμου λιπάσης με βελτιωμένες ιδιότητες, σε DNA κατασκευές που κωδικοποιούν την έκφραση των ρηθέντων παραλλαγών, σε τα κύτταρα ξενιστές ικανά να εκφράζουν τις ποικιλίες από τις DNA κατασκευές, όπως επίσης και σε μια μέθοδο παραγωγής των παραλλαγών μέσω της καλλιέργειας των ρηθέντων ξενιστών κυττάρων.

### Ιστορικό της εφεύρεσης

15 Η έλευση και η ανάπτυξη των τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA είχε βαθιά επίδραση στο πεδίο της χημείας των πρωτεϊνών. Θεωρείται ότι αυτές οι τεχνικές θα καταστήσουν δυνατό το σχεδιασμό πεπτιδίων και πρωτεϊνών, όπως τα ένζυμα, σύμφωνα με ειδικά κριτήρια, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή ενώσεων με επιθυμητές ιδιότητες.

Λόγω της διαθεσιμότητας τέτοιων τεχνικών, έχει καταστεί δυνατή η κατασκευή ενζύμων με επιθυμητές αλληλουχίες αμινοξέων, και πολλές έρευνες έχουν αφιερωθεί σ' αυτό το αντικείμενο.

20 Η πρωτοπαγής δομή ορισμένων λιπασών έχει καθοριστεί και περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Boel et al., *Lipids* 23, 701-706 (1988), de Caro et al., *Biochim. Biophys. Acta* 671, 129-138 (1981), Winkler et al., *Nature* 343, 771-774 (1990)). Περαιτέρω, έχει εξακριβωθεί η τριτοπαγής δομή ενός πολύ μικρότερου αριθμού λιπασών (Winkler et al., *Nature* 343, 771-774 (1990), Brady et al., *Nature* 343, 767-770 (1990) J. D. Schrag et al., *Nature* 351, 1991, pp. 761-764). Από αυτές τις έρευνες φαίνεται ότι οι λιπάσες έχουν κοινά συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά, αλλά από 25 την άλλη πλευρά, υπάρχουν επίσης βασικές δομικές παραλλαγές μεταξύ των λιπασών.

### Σύνοψη της εφεύρεσης

Περαιτέρω έρευνες έχουν δείξει ότι οι βελτιωμένες ιδιότητες των λιπασών μπορούν να προκύψουν με μία ή περισσότερες ειδικές μεταλλαγές στην αλληλουχία του DNA που εκφράζει μια ειδική λιπάση για την απόκτηση παραλλαγών λιπάσης που εμφανίζουν τέτοιες βελτιωμένες ιδιότητες.

30 Συνεπώς, από μian άποψη, η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται σε μια παραλλαγή λιπάσης της γονικής λιπάσης που περιέχει μια καταλυτική δίκην θρυψίνης τριάδα περιλαμβάνουσα μια ενεργή σερίνη κείμενη σε ένα κατ' εξοχήν υδρόφοβο, επιμήκη θύλακα σύνδεσης του μορίου της λιπάσης, όπου το ηλεκτροστατικό φορτίο ή/και η υδροφοβία της λιπιδικής ζώνης επαφής της γονικής λιπάσης αλλάζει με την εξάλειψη ή την αντικατάσταση ενός ή περισσότερων αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων αμινοξέων με ουδέτερο ή θετικά φορτισμένο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, ή/και με την αντικατάσταση ενός ή περισσότερων ουδέτερων καταλοίπων αμινοξέων με θετικά φορτισμένο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, ή/και με εξάλειψη ή αντικατάσταση ενός ή περισσότερων υδρόφιλων καταλοίπων αμινοξέων με υδρόφοβο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων. Προς χάριν ευκολίας, αυτή η παραλλαγή λιπάσης ορίζεται 35 στα ακόλουθα ως παραλλαγή λιπάσης I.

40 Στο παρόν κείμενο, ο όρος «δίκην θρυψίνης» υποδηλώνει ότι η γονική λιπάση αποτελείται από μια καταλυτική τριάδα στο ενεργό κέντρο που αντιστοιχεί σε αυτό της θρυψίνης, π.χ. τα αμινοξέα Ser, His και ένα από τα Asp, Glu, Asn ή Gln. Μερικές λιπάσες μπορούν επίσης να περιλαμβάνουν μια επιφανειακή δομή βρόχου η οποία καλύπτει την ενεργή σερίνη όταν η λιπάση είναι σε ανενεργή μορφή (ένα παράδειγμα μιας τέτοιας λιπάσης περιγράφεται υπό Brady et al., *Nature* 343, 1990, pp. 767-770). Όταν η λιπάση ενεργοποιείται, η δομή βρόχου μετατοπίζεται 45 ώστε να εκθέσει τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, δημιουργώντας μια επιφάνεια με αυξημένη επιφανειακή υδροφοβία η οποία αλληλεπιδρά με το λιπιδικό υπόστρωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Για αυτό το σκοπό, αυτή η επιφάνεια ορίζεται ως η «λιπιδική ζώνη επαφής», που προορίζεται να περιλάβει τα κατάλοιπα αμι-



νοξέων που βρίσκονται εντός ή σχηματίζουν μέρος της επιφάνειας. Αυτά τα κατάλοιπα μπορούν να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση της λιπάσης με το υπόστρωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης όπου η λιπάση υδρολύει τριγλυκερίδια από τη λιπιδική φάση όταν ενεργοποιείται από την επαφή με την λιπιδική επιφάνεια. Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων, σχηματίζονται σε διάφορες ποσότητες λιπαρά οξέα και μονο- και δι-γλυκερίδια. Ένας λόγος για την αλλαγή του ηλεκτροστατικού φορτίου ή/και της υδροφοβίας της λιπιδικής ζώνης επαφής μέσω μετάλλαξης της λιπάσης σε αυτή τη ζώνη είναι ότι τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης μπορούν να παραμείνουν στη λιπιδική φάση, σχηματίζοντας έτσι μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια. Όταν η λιπάση χρησιμοποιείται για σκοπούς πλύσης, τα αρνητικά φορτισμένα απορρυπαντικά μπορούν να σχηματίσουν αρνητικά φορτία πάνω στη λιπιδική επιφάνεια. Έτσι, με την παρασκευή των παραλλαγών λιπάσης που είναι λιγότερο αρνητικά φορτισμένες ή/και περισσότερο υδρόφοβες, είναι δυνατό να ληφθούν λιπάσες με διαφορετικές εξιδεικεύσεις ή/και βελτιωμένες ιδιότητες.

Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται επίσης σε μια κατασκευή DNA περιλαμβάνουσα μια αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί μια παραλλαγή λιπάσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε έναν ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης που φέρει η ρηθείσα κατασκευή DNA, σε ένα κύτταρο μεταμορφωμένο με τη κατασκευή DNA ή τον φορέα έκφρασης, όπως επίσης σε μια μέθοδο παραγωγής μιας παραλλαγής λιπάσης της εφεύρεσης μέσω καλλιέργειας ή ανάπτυξης του ρηθέντος κυττάρου υπό συνθήκες που οδηγούν στην παραγωγή της παραλλαγής λιπάσης, μετά την οποία η παραλλαγή λιπάσης ανακτάται από την καλλιέργεια.

Η εφεύρεση αναφέρεται περαιτέρω σε ένα απορρυπαντικό πρόσθετο περιέχον μια παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης, κατ' επιλογήν με τη μορφή μιας μη κωνιώδους κόκκου, σταθεροποιημένου υγρού ή προστατευμένου ενζύμου, όπως επίσης σε μια απορρυπαντική σύνθεση περιλαμβάνουσα την παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης.

#### Λεπτομερής περιγραφή της εφεύρεσης

Στην παρούσα περιγραφή και στις αξιώσεις, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες συντομογραφίες:

25	<u>Αμινοξέα:</u>				
	A	=	Ala	=	Αλανίνη
	V	=	Val	=	Βαλίνη
	L	=	Leu	=	Λευκίνη
	I	=	Ile	=	Ισολευκίνη
30	P	=	Pro	=	Προλίνη
	F	=	Phe	=	Φαινυλαλανίνη
	W	=	Trp	=	Τρυπτοφάνη
	M	=	Met	=	Μεθειονίνη
	G	=	Gly	=	Γλυκίνη
35	S	=	Ser	=	Σερίνη
	T	=	Thr	=	Θρεονίνη
	C	=	Cys	=	Κυστεΐνη
	Y	=	Tyr	=	Τυροσίνη
	N	=	Asn	=	Ασπαραγίνη
40	Q	=	Gln	=	Γλουταμίνη
	D	=	Asp	=	Ασπαρτικό οξύ
	E	=	Glu	=	Γλουταμινικό οξύ
	K	=	Lys	=	Λυσίνη
	R	=	Arg	=	Αργινίνη
45	H	=	His	=	Ιστιδίνη

Στην περιγραφή των παραλλαγών λιπάσης σύμφωνα με την εφεύρεση, χρησιμοποιείται η ακόλουθη ονοματολογία προς ευκολία αναφοράς:

Αρχικό αμινοξύ (-έα): θέση (-εις): υποκατεστημένο αμινοξύ (-έα)

Σύμφωνα με αυτή την ονοματολογία, για παράδειγμα η αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από γλυκίνη στη θέση 195 απεικονίζεται ως εξής:

Gly 195 Glu ή G195E

η εξάλειψη της γλυκίνης στην ίδια θέση απεικονίζεται ως:

Gly 195 \* ή G195\*

και η ένθεση ενός πρόσθετου κατάλοιπου αμινοξέος όπως η λυσίνη απεικονίζεται ως:

Gly 195 GlyLys ή G195GK

Όπου η ειδική λιπάση περιλαμβάνει μια «εξάλειψη» συγκριτικά με άλλες λιπάσες και εκτελείται μια ένθεση σε μια τέτοια θέση αυτό υποδεικνύεται ως εξής:

\* 36 Asp ή \*36D

για την ένθεση ενός ασπαρτικού οξέος στη θέση 36

Οι πολλαπλές μεταλλαγές διαχωρίζονται με συν, π.χ.:

Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu ή R170Y + G195E

παριστάνει μεταλλαγές στις θέσεις 170 και 195 υποκαθιστώντας την τυροσίνη και το γλουταμινικό οξύ με αργινίνη και γλυκίνη, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με την εφεύρεση, η παραλλαγή λιπάσης I είναι κατά προτίμηση μια παραλλαγή στην οποία ένα ή περισσότερα κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος ή ασπαρτικού οξέος της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιπάσης αντικαθίστανται από γλουταμίνη, ασπαραγίνη, αλανίνη, λευκίνη, βαλίνη, σερίνη, θρεονίνη, λυσίνη ή αργινίνη.

Παρόλο που η γονική λιπάση μπορεί να εξαχθεί από μια ποικιλία πηγών όπως λιπάσες θηλαστικών, π.χ. πανγκρεατικές, γαστρικές, ηπατικές ή λιποπρωτεϊνικές λιπάσες, γενικώς προτιμάται να είναι μια μικροβιακή λιπάση. Ως τέτοια, η γονική λιπάση επιλέγεται από ζυμομύκητα, π.χ. λιπάσες Candida, ή βακτήριο, π.χ. λιπάσες Pseudomonas ή μύκητα, π.χ. λιπάσες Humicola ή Rhizomucor. Ιδιαίτερα προτιμάται η επιλογή της γονικής λιπάσης από μια ομάδα δομικώς ομόλογων λιπασών.

Σε μια προτιμώμενη ενσωμάτωση της παραλλαγής λιπάσης I της εφεύρεσης, η γονική λιπάση είναι μια λιπάση Rhizomucor miehei, ειδικότερα η λιπάση που περιγράφεται στην EP 305 216. Σε αυτή την ενσωμάτωση, ένα ή περισσότερα κατάλοιπα αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων μπορούν να υποκατασταθούν με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα θετικά φορτισμένων ή ουδέτερων αμινοξέων ως ακολούθως:

D91N, K, R, A, V, L, S, T  
D256N, K, R, A, V, L, S, T  
D226N, K, R, A, V, L, S, T  
D61N, K, R, A, V, L, S, T  
D113N, K, R, A, V, L, S, T  
E201Q, K, R, A, V, L, S, T  
D243N, K, R, A, V, L, S, T.

Σε μια άλλη προτιμώμενη ενσωμάτωση της παραλλαγής λιπάσης I της εφεύρεσης, η γονική λιπάση είναι μια λιπάση Humicola lanuginosa, ειδικότερα η λιπάση που παράγεται από το στέλεχος DSM 4106 του H. lanuginosa (βλέπε EP 258 068). Σε αυτή την ενσωμάτωση, ένα ή περισσότερα αρνητικώς φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων μπορούν να αντικατασταθούν με ένα ή περισσότερα ουδέτερα ή θετικώς φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων ως κάτωθι:

5 E87Q, K, R, A, N, T, S, L, V.  
D254N, K, R, A, Q, T, S, L, V.  
D242N, K, R, A, Q, T, S, L, V.  
E210Q, K, R, A, N, T, S, L, V.  
E56Q, K, R, A, N, T, S, L, V.  
D96N, K, R, A, Q, T, S, L, V.  
D111N, K, R, A, Q, T, S, L, V.  
D62A, Q, N, T, S, K, R, L, V.  
E219A, Q, N, T, S, K, R, L, V.  
10 E234A, Q, N, T, S, K, R, L, V.  
E57A, Q, N, T, S, K, R, L, V.  
E99A, Q, N, T, S, K, R, L, V.  
D27A, Q, N, T, S, K, R, L, V. ή  
E239A, Q, N, T, S, K, R, L, V.

15

Ιδιαίτερα προτιμώμενες αντικαταστάσεις σύμφωνα με την εφεύρεση είναι

20 E87Q + D254N + D242N + E210Q.  
E87Q + D254N + E210Q.  
D96N + E87Q + D254N.  
R209A + E210A.

Εναλλακτικά, ένα ή περισσότερα κατάλοιπα ουδέτερων αμινοξέων μπορεί να αντικατασταθούν με ένα ή περισσότερα θετικώς φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων ως κάτωθι:

25 T267K, R.  
S85K, R.  
T226K, R.  
N88K, R.  
N92K, R.  
30 I255K, R.  
I202K, R.  
L206K, R.  
L259K, R.  
V203K, R. ή  
35 L227K, R

40 Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η λιπάση Humicola lanuginosa και η λιπάση Rhizomucor miehei ανήκουν στην ίδια ομάδα λιπασών. Αυτό συνεπάγεται ότι η συνολική τριωδιότατη δομή των δύο λιπασών μοιάζει πολύ και έχει δειχθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ότι είναι υψηλά ομόλογες (ένα μοντέλο υπολογιστή της λιπάσης H. lanuginosa και της Rh. miehei απεικονίζεται στις Εικόνες 1Α και Β και 2Α και Β, αντίστοιχα, από τις οποίες οι ομοιότητες ανάμεσα στις λιπιδικές ζώνες επαφής των δύο λιπασών διακρίνονται σαφώς). Συνεπώς, είναι πιθανόν ότι οι τροποποιήσεις του υποδεικνυόμενου τύπου για κάθε λιπάση να είναι επίσης λειτουργικές για την άλλη λιπάση.

45 Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με την εφεύρεση, οποιαδήποτε των τροποποιήσεων της αλληλουχίας των αμινοξέων που αναφέρθηκε παραπάνω για την παραλλαγή λιπάσης I μπορεί να συνδυαστεί με οποιαδήποτε άλλη τροποποίηση που αναφέρθηκε παραπάνω ή με οποιαδήποτε των τροποποιήσεων για τις παραλλαγές II και III που περιγράφονται στην WO 92/05249.



Μέθοδοι παρασκευής των παραλλαγών λιπάσης της εφευρέσεως

Μερικές μέθοδοι για την εισαγωγή μεταλλάξεων σε γονίδια είναι γνωστές στην τεχνική. Μετά από μια σύντομη συζήτηση για την κλωνοποίηση των κωδικοποιητικών της λιπάσης DNA αλληλουχιών, θα συζητηθούν οι μέθοδοι δημιουργίας μεταλλαγών σε ειδικές θέσεις στην αλληλουχία κωδικοποίησης της λιπάσης.

5

Κλωνοποίηση μιας κωδικοποιητικής της λιπάσης αλληλουχίας DNA

Η DNA αλληλουχία που κωδικοποιεί μια γονική λιπάση μπορεί να απομονωθεί από ένα οποιοδήποτε κύτταρο ή μικροοργανισμό που παράγει την υπο συζήτηση λιπάση με διάφορες μεθόδους, γνωστές στην τεχνική. Πρώτον ένα γονιδιακό DNA ή/και μια βιβλιοθήκη cDNA θα πρέπει να κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας χρωμοσωμικό DNA ή αγγελιαφόρο RNA από τον οργανισμό που παράγει την υπό μελέτη λιπάση. Ακολούθως, αν η αλληλουχία αμινοξέων της λιπάσης είναι γνωστή, μπορούν να παρασκευαστούν και να χρησιμοποιηθούν ομόλογοι επισημασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές στην αναγνώριση των κλώνων που κωδικοποιούν τη λιπάση από μια βιβλιοθήκη του γονιδιώματος του βακτηριακού DNA, ή από μια βιβλιοθήκη από ένα μυκητιακό cDNA. Εναλλακτικά, ένας επισημασμένος ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής που περιλαμβάνει αλληλουχίες ομόλογες της λιπάσης από άλλο στέλεχος βακτηρίων ή μύκητων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής για την εξακρίβωση των κλώνων που κωδικοποιούν τη λιπάση, με τη χρήση συνθηκών υβριδοποίησης και ξεπλύματος ελαττωμένης αυστηρότητας.

Επιπλέον άλλη μια μέθοδος για την εξακρίβωση κλώνων που παράγουν λιπάση περιλαμβάνει την ένθεση θραυσμάτων γονιδιακού DNA εντός ενός φορέα έκφρασης, όπως ένα πλασμίδιο, τη μεταμόρφωση βακτηρίων αρνητικών στη λιπάση με την προκύπτουσα βιβλιοθήκη γονιδιακού DNA, και ακολούθως την τοποθέτηση των μεταμορφωμένων βακτηρίων σε άγαρ που περιέχει ένα υπόστρωμα για τη λιπάση. Αυτά τα βακτήρια που περιέχουν πλασμίδιο που φέρει λιπάση θα παράγουν αποικίες περιβαλλόμενες από μια άλω διαυγούς άγαρ, λόγω της χώνευσης του υποστρώματος από την αποβαλλόμενη λιπάση.

Εναλλακτικά, η DNA αλληλουχία που κωδικοποιεί το ένζυμο μπορεί να παρασκευαστεί συνθετικά με καθιερωμένες τυπικές μεθόδους, π.χ. τη φωσφοαμιδική μέθοδο που περιγράφεται υπό S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869, ή τη μέθοδο που περιγράφεται υπό Matthes et al., *The EMBO J.* 3, 1984, pp. 801-805. Σύμφωνα με τη φωσφοαμιδική μέθοδο, τα ολιγονουκλεοτίδια παρασκευάζονται, π.χ., εντός ατόματος παρασκευαστή DNA, καθαρίζονται, ανασυνδέονται, συνδέονται και κλωνοποιούνται εντός κατάλληλων φορέων. Τελικώς, η DNA αλληλουχία μπορεί να είναι μικτής γονιδιακής και συνθετικής, μικτής συνθετικής και cDNA ή μικτής γονιδιακής και cDNA προέλευσης παρασκευασμένη από τη σύνδεση θραυσμάτων συνθετικής, γονιδιακής ή cDNA προέλευσης (όπως συμφέρει), όπου τα θραύσματα αντιστοιχούν στα διάφορα τμήματα όλης της DNA αλληλουχίας, σύμφωνα με πρότυπες τεχνικές. Η DNA αλληλουχία μπορεί επίσης να παρασκευαστεί από αλυσιδωπή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές, για παράδειγμα όπως περιγράφεται στην US 4.683.202 ή υπό R. K. Saiki et al., *Science* 239, 1988, pp. 487-491.

35

Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί τη λιπάση

Όταν απομονωθεί η DNA αλληλουχία που κωδικοποιεί τη λιπάση, και έχουν εξακριβωθεί οι επιθυμητές θέσεις για τη μεταλλαγή, οι μεταλλαγές μπορούν να εισαχθούν με τη χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια περιέχουν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που στέκονται δίπλα στις επιθυμητές θέσεις μεταλλαγής. Τα μεταλλαγμένα νουκλεοτίδια εισάγονται κατά τη διάρκεια της ολιγονουκλεοτιδικής σύνθεσης. Σε μια ειδική μέθοδο, ένα μονόκλωνο χάσμα του DNA που γεφυρώνει την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη λιπάση, δημιουργείται εντός ενός φορέα που φέρει το γονίδιο λιπάσης. Ακολούθως το συνθετικό νουκλεοτίδιο, που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή, ανασυνδέεται σε μια ομόλογη περιοχή του μονόκλωνου DNA. Το παραμένον χάσμα ακολούθως πληρούται με DNA πολυμεράση I (θραύσμα Klepaw) και η δομή συνδέεται με τη χρήση λιγκάσης T4. Σε ένα ειδικό παράδειγμα αυτής της μεθόδου περιγράφεται υπό Morinaga et al., (1984, *Biotechnology* 2: 646-639). Στην Ευρ. ΗΠΑ Νο. 4.760.025 υπό Estell et al., που δημοσιεύτηκε στις 26 Ιουλίου 1988, περιγράφεται η εισαγωγή ολιγονουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν πολλαπλές μεταλλαγές μέσω πραγματοποίησης ελάχιστων τροποποιήσεων της κας-

45

υέτις, εντούτοις, μπορεί να εισαχθεί μια ακόμη μεγαλύτερη ποικιλία μεταλλάγων σε οποιοδήποτε χρόνο με τη μέθοδο Morinaga, επειδή μπορεί να εισαχθεί μια πολλαπλότητα ολιγονουκλεοτιδίων με διαφορετικά μήκη.

Μια άλλη μέθοδος εισαγωγής μεταλλαγών σε αλληλουχίες που κωδικοποιούν τη λιπάση περιγράφεται υπό Nelson and Long, Analytical Biochemistry 180, 1989, pp. 147-151. Αυτή περιλαμβάνει την εκ τριών σταδίων δημιουργία ενός θραύσματος PCR που περιέχει την επιθυμητή μεταλλαγή που εισάγεται με τη χρήση ενός χημικά παρασκευασμένου κλώνου DNA ως ένα από τους εκκινητές στις αντιδράσεις PCR. Από το από την PCR δημιουργούμενο θραύσμα, μπορεί να απομονωθεί ένα θραύσμα DNA περιέχον τη μεταλλαγή μέσω διάσπασης με ενδονουκλεάσεις περιορισμού και την επανένθεση σε ένα πλασμίδιο έκφρασης (βλέπε επίσης τις Εικ. 3 και 4 στις οποίες απεικονίζεται περαιτέρω αυτή η μέθοδος).

10

#### Έκφραση των παραλλαγών λιπάσης

Σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση, μια μεταλλαγμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί τη λιπάση που παράγεται με τις ανωτέρω περιγραφείσες μεθόδους, ή με οποιαδήποτε εναλλακτική μέθοδο γνωστή στην τεχνική, μπορεί να εκφραστεί σε ενζυμική μορφή, με τη χρήση ενός φορέα έκφρασης ο οποίος τυπικά περιλαμβάνει αλληλουχίες ελέγχου που κωδικούν έναν προαγωγέα, έναν χειριστή, τη ριβοσωμική θέση δέσμευσης, τη μετάφραση του σήματος έναρξης, και κατ' επιλογήν ένα γονιδιακό καταστολέα ή διάφορους γονιδιακούς ενεργοποιητές. Για να επιτραπεί η απέκκριση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης, τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν ένα «σήμα αλληλουχίας» μπορούν να εισαχθούν πριν την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη λιπάση. Για την έκφραση υπό τη φορά των αλληλουχιών ελέγχου, ένα γονίδιο στόχος προς επεξεργασία σύμφωνα με την εφεύρεση συνδέεται λειτουργικά με τις αλληλουχίες ελέγχου στο κατάλληλο πλαίσιο αντίληψης. Οι αλληλουχίες του προαγωγέα που μπορούν να ενσωματωθούν στους πλασμειδικούς φορείς, και οι οποίες μπορούν να στηρίξουν τη μεταγραφή του μεταλλαγμένου γονιδίου λιπάσης, περιλαμβάνουν χωρίς περιορισμό τον προκαρυωτικό προαγωγέα β-λακταμάσης (Villa-Komaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731) και τον προαγωγέα tac (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Περαιτέρω αναφορές μπορούν επίσης να βρεθούν στο «Useful proteins from recombinant bacteria» στο Scientific American, 1980, 242: 74-94.

Σύμφωνα με μια ενσωμάτωση ο B. subtilis μεταμορφώνεται από έναν φορέα έκφρασης που φέρει το μεταλλαγμένο DNA. Αν η έκφραση πρόκειται να λάβει χώρα σε έναν απεκριτικό μικροοργανισμό όπως ο B. subtilis μια αλληλουχία σήματος μπορεί να ακολουθήσει τη μετάφραση του σήματος έναρξης και προηγείται της DNA αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει. Η αλληλουχία σήματος δρα για τη μεταφορά του προϊόντος έκφρασης στο κυτταρικό τοίχωμα όπου διασπάται από το προϊόν κατά την απέκκριση. Ο όρος «αλληλουχίες ελέγχου» όπως ορίζονται ανωτέρω περιλαμβάνουν μια αλληλουχία σήματος, όταν είναι παρούσα.

Στην παρούσα προτιμώμενη μέθοδο παραγωγής παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης, ως ξενιστής οργανισμός χρησιμοποιείται ένας νηματώδης μύκητας. Ο ξενιστής οργανισμός νηματώδης μύκητας μπορεί προσφόρως να είναι ένας μύκητας που έχει χρησιμοποιηθεί προηγουμένως ως ξενιστής προς παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, π.χ. ένα στέλεχος του Aspergillus sp., όπως A. niger, A. nidulans ή A. oryzae. Η χρήση του A. oryzae στην παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών περιγράφεται εκτενώς, π.χ. στην EP 238 023.

Για την έκφραση των παραλλαγών λιπάσης στον Aspergillus, ένας προαγωγέας προηγείται της DNA αλληλουχίας που κωδικοποιεί την παραλλαγή λιπάσης. Ο προαγωγέας μπορεί να είναι οποιαδήποτε αλληλουχία DNA που εμφανίζει μια ισχυρή μεταγραφική δραστηριότητα στον Aspergillus και μπορεί να εξαχθεί από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια εξωκυτταρική ή εσωκυτταρική πρωτεΐνη όπως μια αμυλάση, μια γλυκοαμυλάση, μια πρωτεάση, μια λιπάση, μια κυτταρινάση ή ένα γλυκολυτικό ένζυμο.

Παραδείγματα κατάλληλων προαγωγέων είναι οι εξαγόμενοι από το γονίδιο που κωδικοποιεί την αμυλάση TAKA A. oryzae, Rhizomucor miehei ασπαρική πρωτεΐνάση, A. niger ουδέτερη α-αμυλάση, A. niger σταθερή σε οξέα α-αμυλάση, A. niger γλυκοαμυλάση, Rhizomucor miehei λιπάση, A. oryzae αλκαλική πρωτεάση ή A. oryzae ισομεράση φωσφορικής τριόζης.

Ειδικότερα όταν ο ξενιστής οργανισμός είναι ο A. oryzae, ένας προτιμώμενος προαγωγέας για χρήση στη μέθοδο της παρούσας εφεύρεσης είναι ο προαγωγέας αμυλάση A. oryzae TAKA καθώς εμφανίζει μια ισχυρή μετα-

γραφική δραστηριότητα στον A. oryzae. Η αλληλουχία του προαγωγέα της αμυλάσης TAKA περιγράφεται στην EP 238 023.

Οι αλληλουχίες τερματισμού και πολυαδενυλίωσης μπορούν κατάλληλα να εξαχθούν από τις ίδιες πηγές όπως του προαγωγέα.

5 Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μεταμόρφωση ενός ξενιστή κυττάρου μύκητα μπορούν να είναι κατάλληλως όπως περιγράφονται στην EP 238 023.

Για τη διασφάλιση της απέκκρισης της παραλλαγής λιπάσης από το κύτταρο ξενιστή, ένα σήμα αλληλουχίας προηγείται της DNA αλληλουχίας που κωδικοποιεί την παραγωγή της λιπάσης το οποίο μπορεί να είναι ένα φυσικώς απαντώμενο σήμα αλληλουχίας ή ένα δραστικό τμήμα αυτού ή μια συνθετική αλληλουχία παρέχουσα έκκριση της πρωτεΐνης από το κύτταρο. Ειδικότερα, η αλληλουχία σήματος μπορεί να προέρχεται από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια αμυλάση ή γλυκοαμυλάση Aspergillus sp., ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια λιπάση ή πρωτεάση Rhizomucor miehei, ή ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια κυτταρινάση ξυλανάση ή λιπάση Humicola. Η αλληλουχία σήματος κατά προτίμηση εξάγεται από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την αμυλάση TAKA A. oryzae, την ουδέτερη α-αμυλάση A. niger, την σταθερή σε οξέα α-αμυλάση A. niger ή την γλυκοαμυλάση A. niger.

15 Το μέσο που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των μεταμορφωμένων κυττάρων ξενιστών μπορεί να είναι οποιοδήποτε συμβατικό μέσο κατάλληλο για την ανάπτυξη των κυττάρων Aspergillus. Οι μεταμορφωμένοι τύποι είναι συνήθως σταθεροί και μπορούν να καλλιεργηθούν απουσία επιλεκτικής πίεσης. Εντούτοις, αν οι μεταμορφωμένοι τύποι βρεθούν ότι είναι ασταθείς, ένας εισαγόμενος δείκτης επιλογής στα κύτταρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή.

20 Η απεκκρινόμενη πρωτεΐνη ώριμης λιπάσης από τα κύτταρα ξενιστές μπορεί προσφύτως να αντικηθεί από το μέσο καλλιέργειας με γνωστές μεθόδους που περιλαμβάνουν το διαχωρισμό των κυττάρων από το μέσο μέσω φυγοκέντρησης ή διήθησης, και την κατακρήμνιση των πρωτεϊνικών συστατικών του μέσου με ένα άλας όπως θειικό αμμώνιο, με ακόλουθες χρωματογραφικές μεθόδους όπως ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία, χρωματογραφία συγγένειας και τα παρόμοια.

25 Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται επίσης σε ένα απορρυπαντικό πρόσθετο που περιλαμβάνει μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την εφεύρεση, κατά προτίμηση με τη μορφή μη κονιώδους κόκκου, σταθεροποιημένου υγρού ή προστατευμένου ενζύμου. Οι μη κονιώδεις κόκκοι μπορούν να παραχθούν π.χ. σύμφωνα με τις EP. ΗΠΑ 4.106.991 και 4.661.452 (αμφότερες της Novo Industry A/S) και μπορούν κατ' επιλογήν να επικαλυφθούν με μεθόδους γνωστές στην τεχνική. Τα υγρά ενζυμικά παρασκευάσματα μπορούν, π.χ., να σταθεροποιηθούν με την προσθήκη μιας πολυόλης όπως προπυλενογλυκόλη, ενός σακχάρου ή σακχαροαλκοόλης, λακτικού οξέος ή βορικού οξέος σύμφωνα με καθιερωμένες μεθόδους. Άλλοι ενζυμικοί σταθεροποιητές είναι γνωστοί στην τεχνική. Τα προστατευμένα ένζυμα μπορούν να παρασκευαστούν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην EP 238 216.

30 Το απορρυπαντικό πρόσθετο μπορεί κατάλληλως να περιέχει από 0,02-200 χλστγρ. ενζυμική πρωτεΐνη ανά γραμμάριο προσθέτου. Θα καταστεί κατανοητό ότι το απορρυπαντικό πρόσθετο μπορεί περαιτέρω να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα άλλα ένζυμα, όπως μια πρωτεάση, κυτταρινάση, υπεροξειδάση ή αμυλάση, περιλαμβανομένων προσφύτως σε απορρυπαντικά πρόσθετα.

Κατά μian ακόμα περαιτέρω άποψη, η εφεύρεση αναφέρεται σε μια απορρυπαντική σύνθεση περιέχουσα μια παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης. Οι απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεσης επιπροσθέτως περιέχουν επιφανειοδραστικά τα οποία μπορούν να είναι ανιοντικού, μη ιονικού, κατιοντικού επαμφοτερίζοντος ή σβιπτεριονικού τύπου όπως επίσης ως μίγματα αυτών των επιφανειοδραστικών κλάσεων. Τυπικά παραδείγματα κατάλληλων επιφανειοδραστικών είναι γραμμικά βενζολοσουλφονικά αλκύλια (LAS), άλφα ολεφινοςουλφονικά (AOS), αλκοολοαιθοξυθειικά (AEOS), αλκοολοαιθοξυλικά (AEO), αλκυλοθειικά (AS), αλκυλοπολυγλυκοζίτες (APG) και άλατα αλκαλιμετάλλων με φυσικά λιπαρά οξέα.

45 Οι απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεσης μπορούν να περιέχουν άλλα απορρυπαντικά συστατικά γνωστά στην τεχνική όπως π.χ. σιμύατα απορρυπαντικών, λευκαντικά, ενεργοποιητές λεύκανσης, αντιδιαβρωτικά, μέσα διαχωρισμού, μέσα αντι-επαναπόθεσης ρύπων, αρώματα, σταθεροποιητές ενζύμου κ.λπ.



Η απορρυπαντική σύνθεση της εφεύρεσης μπορεί να μορφοποιηθεί σε οποιαδήποτε πρόσφορη μορφή, π.χ. ως σκόνη ή υγρό. Το ένζυμο μπορεί να σταθεροποιηθεί σε ένα υγρό απορρυπαντικό μέσω έγκλεισης των σταθεροποιητών ενζύμων όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Συνήθως, το πεχά ενός διαλύματος της απορρυπαντικής σύνθεσης της εφεύρεσης θα είναι 7-12 και σε μερικές περιπτώσεις 7-10,5. Άλλα ενζυμικά απορρυπαντικά όπως πρωτεάσες, κυτταρινάσες, υπεροξειδάσες ή αμιλάσες μπορεί να περιέχονται στις απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεσης, είτε ξεχωριστά είτε σε ένα συνδυασμένο πρόσθετο όπως περιγράφηκε παραπάνω.

#### Σύντομη περιγραφή των σχεδίων

Η παρούσα εφεύρεση περιγράφεται ακολουθώντας με αναφορά στα συναπτόμενα σχέδια, στα οποία  
10 Οι Εικόνες 1Α και Β είναι μοντέλα σχεδιασμένα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και απεικονίζουν μια τρισδιάστατη δομή της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιπάσης H. lanuginosa όταν η λιπάση είναι σε ανενεργή (Α) και ενεργή (Β) μορφή, αντίστοιχα. Τα «λευκά» κατάλοιπα παριστάνουν υδρόφοβα αμινοξέα (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly, και Met), τα «κίτρινα» παριστάνουν υδρόφιλα αμινοξέα (Thr, Ser, Gln, Asp, Tyr και Cys), τα «μπλε» παριστάνουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Lys, Arg και His), και τα «ερυθρά» παριστάνουν αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Glu και Asp).

15 Οι Εικόνες 2Α και 2Β είναι μοντέλα υπολογιστή και απεικονίζουν μια τρισδιάστατη δομή της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιπάσης Rh. miehei όταν η λιπάση είναι σε ανενεργή (Α) και ενεργή (Β) μορφή, αντίστοιχα. Τα «λευκά» κατάλοιπα παριστάνουν υδρόφοβα αμινοξέα (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly, και Met), τα «κίτρινα» παριστάνουν υδρόφιλα αμινοξέα (Thr, Ser, Gln, Asp, Tyr και Cys), τα «μπλε» παριστάνουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Lys, Arg και His), και τα «ερυθρά» παριστάνουν αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Glu και Asp).

20 Η Εικ. 3 είναι μια σχηματική παράσταση της παρασκευής των πλασμιδίων που κωδικοποιούν παραλλαγές λιπάσης μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Η Εικ. 4 είναι μια σχηματική παράσταση της τριών σταδίων μεταλλαξιγένεσης μέσω PCR.

Η Εικ. 5 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού του πλασμιδίου pAO1.

25 Η Εικ. 6 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού του πλασμιδίου pAHL και

Η Εικ. 7 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού του πλασμιδίου pARML.

Η παρούσα εφεύρεση περαιτέρω απεικονίζεται στα ακόλουθα παραδείγματα τα οποία με κανένα τρόπο δεν περιορίζουν το σκοπό της εφεύρεσης ως αξιώνεται.

#### 30 Γενικές μέθοδοι

##### Έκφραση της λιπάσης *Humicola lanuginosa* και της λιπάσης *Rhizomucor miehei* στον *Aspergillus oryzae*:

35 Η κλωνοποίηση της λιπάσης *Humicola lanuginosa* και της λιπάσης *Rhizomucor miehei* περιγράφεται στην ΕΡ 305,216 και ΕΡ 238 023, αντίστοιχα. Αυτές οι εφαρμογές εφευρέσεων επίσης περιγράφουν την έκφραση και το χαρακτηρισμό των δύο λιπασών στον *Aspergillus oryzae*. Τα δύο πλασμίδια έκφρασης που χρησιμοποιούνται ορίζονται ως p960 (που φέρει το γονίδιο λιπάσης *H. lanuginosa*) και p787 (που φέρει το γονίδιο λιπάσης *R. miehei*).

40 Τα πλασμίδια έκφρασης που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εφαρμογή είναι απαράλλακτα με τα p787 και p960, εκτός από ελάχιστες τροποποιήσεις αμέσως στο 3' στις περιοχές κωδικοποίησης της λιπάσης. Οι τροποποιήσεις εκτελέστηκαν με τον ακόλουθο τρόπο: το p960 χωνεύτηκε με τα περιοριστικά ένζυμα NruI και BamHI. Ανάμεσα σε αυτές τις δύο θέσεις το θραύσμα BamHI/NheI από το πλασμίδιο pBR322, στο οποίο το θραύσμα NheI πληρώθηκε με πολυμεράση Klepaw, κλωνοποιήθηκε, και έτσι δημιουργήθηκε το πλασμίδιο pAO1 (Εικ. 5) το οποίο περιέχει τις μοναδικές θέσεις BamHI και NheI. Ανάμεσα σε αυτές τις μοναδικές θέσεις τα θραύσματα BamHI/XbaI από τα p960 και p787 κλωνοποιήθηκαν παρέχοντας το pAHL (Εικ. 6) και pARML (Εικ. 7), αντίστοιχα.

45

Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης in vitro των γονιδίων λιπάσης:

Για την εισαγωγή μεταλλαγών στα γονίδια λιπάσης χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις.

Μια μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η κατευθυνόμενης θέσης μεταλλαξιγένεση ολιγονουκλεοτιδίου η οποία περιγράφεται υπό Zoller & Smith, DNA, Vol. 3, No. 6, 479-488 (1984). Η μέθοδος περιγράφεται εν συντομία ακολουθώς, και περιγράφεται πλήρως στο Παράδειγμα 1.

Το γονίδιο λιπάσης, απομονωμένο από το πλασμίδιο έκφρασης, εισάγεται σε ένα κυκλικό βακτηριοφάγο φορέα M13. Σε ένα μονόκλωνο γονιδίωμα, ανασυνδέεται ένας χημικά παρασκευασμένος συμπληρωματικός κλώνος DNA. Αυτός ο κλώνος DNA περιέχει την προς ένθεση μεταλλαγή ανάμεσα σε αλληλουχίες συμπληρωματικές στις αλληλουχίες λιπάσης στο κυκλικό DNA. Ο εκκινητής (ένανσμα) ακολουθώς εκτείνεται in vitro σε ολόκληρο το μήκος του κυκλικού γονιδιώματος βιοχημικά με τη χρήση πολυμεράσης Klenow. Όταν μεταμορφωθεί στην *E. coli*, το ετερόδιπλο θα δημιουργήσει το δίκλωνο DNA με την επιθυμητή αλληλουχία από την οποία μπορεί να απομονωθεί ένα θραύσμα και να επανεισαχθεί εντός του πλασμιδίου έκφρασης.

Μια άλλη μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται υπό Nelson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989). Αυτή περιλαμβάνει την δημιουργία σε 3 στάδια ενός θραύσματος PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) που περιέχει την επιθυμητή μεταλλαγή που εισάγεται με τη χρήση χημικά παρασκευασμένου κλώνου DNA ως ένα από τους εκκινητές στις αντιδράσεις PCR. Από το δημιουργηθέν μέσω PCR θραύσμα, μπορεί να απομονωθεί μέσω διάσχισης με περιοριστικά ένζυμα ένα θραύσμα DNA που φέρει μια μεταλλαγή και επανεισάγεται στο πλασμίδιο έκφρασης. Αυτή η μέθοδος περιγράφεται πλήρως στο Παράδειγμα 3. Η μέθοδος περαιτέρω απεικονίζεται στις Εικόνες 3 και 4.

Σε μια περαιτέρω μέθοδο, που συνήθως ορίζεται «μεταλλαξιγένεση κασέτας», αντικαθίσταται ένα τμήμα μεταξύ δύο θέσεων περιορισμού της περιοχής που κωδικοποιεί τη λιπάση μέσω ενός συνθετικού θραύσματος DNA που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή.

Παράδειγμα 1:

Κατασκευή ενός πλασμιδίου που εκφράζει την παραλλαγή D96L της λιπάσης *Humicola lanuginosa*

Απομόνωση του γονιδίου λιπάσης:

Το πλασμίδιο έκφρασης p960 περιλαμβάνει την κωδικοποιητική περιοχή για τη λιπάση *Humicola lanuginosa* σε ένα θραύσμα περιορισμού BamHI/XbaI (το DNA και η αλληλουχία αμινοξέων της λιπάσης απεικονίζονται στην Καταχώρηση Αλληλουχίας ID No. 1). Το θραύσμα BamHI/XbaI απομονώθηκε ως ακολούθως: το πλασμίδιο έκφρασης επώαστηκε με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BamHI και XbaI. Οι συνθήκες ήταν: 5 μ.γρ. πλασμιδίου, 10 μονάδες BamHI, 10 μονάδες XbaI, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> και 1 mM DTT σε όγκο 50 μ.λτ. Η θερμοκρασία ήταν 37 °C και ο χρόνος αντίδρασης 2 ώρες. Τα δύο θραύσματα διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% και το επιθυμητό θραύσμα απομονώθηκε από την πηκτή.

Σύνδεση με το φορέα M13mp18:

Χωνεύτηκε ο βακτηριοφάγος φορέας M13mp18 στη δίκλωνη αντιγραφική μορφή αυτού με BamHI και XbaI υπό τις ανωτέρω συνθήκες. Το απομονωθέν θραύσμα περιορισμού συνδέθηκε στο χωνευμένο βακτηριοφάγο φορέα στο ακόλουθο μίγμα αντίδρασης: Θραύσμα 0,2 μ.γρ., φορέας 0,02 μ.γρ., 50 mM Tris-HCl, πεχά 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT και 1 mM ATP σε όγκο 20 μ.λτ. στους 16 °C επί 3 ώρες. Μεταμορφώθηκαν 5 μ.λτ. αυτού του μίγματος στο στελέχος JM101 της *E. coli*. Η παρουσία του θραύσματος εντός του φορέα εξακριβώθηκε με ανάλυση περιοριστικού ενζύμου στο απομονωθέν δίκλωνο M13-DNA από τους μεταμορφωμένους τύπους.

Απομόνωση του μονόκλωνου (ss) DNA (μήτρα):

Από τους μεταμορφωμένους τύπους που περιγράφηκαν παραπάνω, απομονώθηκε το ss-DNA σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε υπό Messing στο Gene, 19, 269-276 (1982).



5' φωσφορυλίωση του εκκινητή μεταλλαξιγένεσης:

Φωσφορυλιώθηκε ο εκκινητής μεταλλαξιγένεσης με την αλληλουχία 5'-TTTCTTTCAACAAGAAGTTAAGA-3' στο τέλος της 5' εντός μίγματος αντίδρασης 30 μλτ. περιέχοντος 70 mM Tris-HCl, πεχά 7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT και 1 mM ATP, 100 pMol ολιγονουκλεοτιδίου και 3,6 μονάδες πολυνουκλεοτιδίου κινάσης T4. Η αντίδραση εκτελέστηκε επί 30 λεπτά στους 37°C. Ακολούθως, το ένζυμο αδρανοποιήθηκε με επώαση του μίγματος επί 10 λεπτά στους 65°C.

Ανασύνδεση της μήτρας και φωσφορυλιωμένου εκκινητή μεταλλαξιγένεσης:

Η ανασύνδεση της μήτρας και του εκκινητή εκτελέστηκε εντός όγκου 10 μλτ. περιέχοντος 0,5 pMol μήτρας, 5 pMol εκκινητή, 20 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl και 1 mM DTT με θέρμανση επί 10 λεπτά στους 65°C και ακόλουθη ψύξη στους 0°C.

Αντίδραση επέκτασης/σύνδεσης:

Στο ανωτέρω μίγμα αντίδρασης, προστέθηκαν 10 μλτ. του ακόλουθου μίγματος: 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP, 0,3 mM dGTP, 0,3 mM TTP, 1 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 3 μονάδες λιγκάσης T4 DNA και 2,5 μονάδες πολυμεράσης Klenow. Ακολούθως, η αντίδραση εκτελέστηκε επί 16 ώρες στους 16°C.

Μεταμόρφωση του JM101:

Το ανωτέρω μίγμα αντίδρασης μεταμορφώθηκε σε διάφορες αραιώσεις εντός κατεργασμένων με CaCl<sub>2</sub> κυττάρων JM101 της E.coli με τη χρήση πρότυπων τεχνικών και καλλιεργήθηκαν σε άνω πλάκες άγαρ 2 x YT σε πλάκες άγαρ 2 x YT (2 x YT = τρυπτόνη 16 γρ./λτ., εκχύλισμα ζυμομύκητα 10 γρ./λτ., NaCl 5 γρ./λτ. Προστέθηκε 2 x YT άνω άγαρ = 2 x YT με αгарόζη 0,4% και φέροντο σε αυτόκλειστο. Προστέθηκαν πλάκες άγαρ 2 x YT = 2 x YT με άγαρ 2% και φέροντο σε αυτόκλειστο).

Οι πλάκες επώαστηκαν ολονυκτίως στους 37°C.

Εξακρίβωση των θετικών κλώνων:

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν υβριδοποίηση σε κεκλιμένη πλάκα η οποία περιγράφεται ως ακολούθως: Φέροντο ένας ηθμός νιτροκυτταρίνης σε μια πλάκα με κατάλληλη πυκνότητα πλάκας, έτσι ώστε να διαβρέχεται ο ηθμός. Ακολούθως ο ηθμός φέροντο σε λουτρό στα ακόλουθα διαλύματα: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH επί 30 δευτερόλεπτα, 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, πεχά 8 επί 1 λεπτό και 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M κιτρικό νάτριο) για μεταγενέστερη χρήση. Ο ηθμός ξηράνθηκε σε διηθητικό χαρτί 3 MM και ψήθηκε επί 2 ώρες στους 80°C σε φούρνο κενού.

Ο εκκινητής μεταλλαξιγένεσης με την αλληλουχία 5'-TTTCTTTCAACAAGAAGTTAAGA-3' ραδιοσημάνθηκε στο 5' άκρο εντός όγκου 30 μλτ. περιέχοντος 70 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 10 pM ολιγονουκλεοτίδιο, 20 pM γ-32P-ATP και 3,5 μονάδες πολυνουκλεοτιδίου κινάσης T4. Το μίγμα επώαστηκε στους 37°C επί 30 λεπτά και ακολούθως επί 5 λεπτά στους 100°C.

Ο ξηρανθείς ηθμός υβριδώθηκε προκαταρκτικά επί 2 ώρες στους 65°C σε 6 x SSC, 0,2% βόεια οροαλβουμίνη, 0,2% Ficoll, 0,2% πολυβινυλοπυρρολιδόνη, 0,2% δωδεκυλθειικό νάτριο (SDS) και 50 μγρ./χλστλτ. DNA σπέρματος σολωμού κατεργασμένο με υπερήχους. Ακολούθως, το περιέχον το σημασμένο ανιχνευτή μίγμα αντίδρασης προστέθηκε σε 15 χλστλτ. φρέσκου μίγματος προκαταρκτικής υβρίδωσης, και ο ηθμός φέροντο εντός αυτού ολονυκτίως στους 27°C με ήπια ανακίνηση. Μετά την υβρίδωση, ο ηθμός ξεπλύθηκε 3 φορές κάθε φορά επί 15 λεπτά σε 2 x SSC, 0,1% SDS και αυτοραδιογραφήθηκε. Μετά το ξέπλυμα στο ίδιο διάλυμα, αλλά τώρα στους 50°C, και με άλλη αυτοραδιογραφία, εξακριβώθηκαν οι πλάκες οι περιέχουσες αλληλουχίες DNA συμπληρωματικές του εκκινητή μεταλλαξιγένεσης.

Επειδή ο εξακριβωμένος κλώνος είναι αποτέλεσμα ενός ετερόδωπου, η πλάκα καλλιεργήθηκε πάλι. Επαναλήφθηκαν τα στάδια υβρίδωσης και εξακρίβωσης.

(ισορροπημένη με Tris-HCl, πεχά 7,5) και κατακρημνίστηκε με προσθήκη 2 όγκων παγορρυχόμενης αιθανόλης 96%. Μετά από φυγοκέντρωση και ξήρανση του σφαιρίου, το γραμμοποιημένο DNA διαλύθηκε εντός 50 μλ. ύδατος και η συγκέντρωση υπολογίστηκε σε πηκτή αγαρόζης.

5 Μεταλλαξιγένεση σε 3 στάδια PCR:

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, η 3 σταδίων μεταλλαξιγένεση περιλαμβάνει τη χρήση τεσσάρων εκκινητών:

Εκκινητής μεταλλαξιγένεσης: (=A): 5'-GTGCGCAGGGATGTTCCGGAATGTTAGG-3'

Βοηθός PCR 1 (=B): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCCTCTACCTATTTAAATCGGC-3'

Βοηθός PCR 2 (=C): 5'-CCATGGCTTTACGGTGTCT-3'

10 Λάβή PCR (=D): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

Τα 3 στάδια εκτελέστηκαν με το ακόλουθο ρυθμιστικό το οποίο περιέχει: 10 mM Tris-HCl, πεχά 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% ζελατίνη, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM TTP, 2,5 μονάδες πολυμεράσης Taq.

15 Στο στάδιο 1, προστέθηκαν 100 pMol εκκινητή A, 100 pMol εκκινητή B και 1 fMol γραμμοποιημένου πλασμιδίου σε ένα σύνολο από 100 μλ. μίγματος αντίδρασης και εφαρμόστηκαν 15 κύκλοι των 2 λεπτών στους 95°C, των 2 λεπτών στους 37°C και των 3 λεπτών στους 72°C.

Η συγκέντρωση του προϊόντος PCR εκτιμήθηκε σε πηκτή αγαρόζης. Ακολούθως, εκτελέστηκε το στάδιο 2. Περιελήφθηκαν 0,6 pMol προϊόντος του σταδίου 1 και 1 fMol γραμμοποιημένου πλασμιδίου σε ένα σύνολο από 100 μλ. του ανωτέρω αναφερθέντος ρυθμιστικού και εφαρμόστηκε 1 κύκλος από 5 λεπτά στους 95°C, 2 λεπτά στους 37°C και 10 λεπτά στους 72°C.

20 Στο μίγμα αντίδρασης του σταδίου 2, προστέθηκαν 100 pMol εκκινητή C και 100 pMol εκκινητή D (καθένα 1 μλ.) και εφαρμόστηκαν 20 κύκλοι των 2 λεπτών στους 95°C, των 2 λεπτών στους 37°C και των 3 λεπτών στους 72°C. Αυτός ο χειρισμός περιελάμβανε το στάδιο 3 στη διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης.

25 Απομόνωση του μεταλλαγμένου θραύσματος περιορισμού:

Το προϊόν από το στάδιο 3 απομονώθηκε από πηκτή αγαρόζης και διαλύθηκε ξανά σε 20 μλ. ύδατος. Ακολούθως, χωνεύτηκε με το περιοριστικό ένζυμο BspMII σε συνολικό όγκο 50 μλ. με την ακόλουθη σύνθεση: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, πεχά 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT και 10 μονάδες BspMII. Εκτελέστηκε επώαση στους 37°C επί 2 ώρες. Το θραύσμα 264 bp BspMII απομονώθηκε από μια πηκτή αγαρόζης.

30

Σύνδεση στο φορέα έκφρασης pAHL:

Το πλασμίδιο έκφρασης pAHL διασχίστηκε με BspMII υπό τις ανωτέρω συνθήκες και απομονώθηκε το μεγάλο θραύσμα από μια πηκτή αγαρόζης. Το απομονωθέν μεταλλαγμένο θραύσμα ως ανωτέρω συνδέθηκε με αυτόν το φορέα, και το μίγμα σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε προς μεταμόρφωση της E. coli. Η παρουσία και ο προσινατισμός του θραύσματος επιβεβαιώθηκε μέσω διάσχισης ενός παρασκευάσματος πλασμιδίου από ένα τύπο μεταμόρφωσης με περιοριστικά ένζυμα. Η ανάλυση αλληλουχίας εκτελέστηκε στο δίκλωνο πλασμίδιο με τη χρήση της μεθόδου τερματισμού της διδεοξυ αλυσίδας που ανέπτυξε ο Sanger. Το πλασμίδιο ονομάστηκε pAHL254N και είναι απαράλλακτο με το pAHL, εκτός από το αλλαγμένο κωδικόνιο.

40 Παράδειγμα 4: Κατασκευή των πλασμιδίων που εκφράζουν άλλες παραλλαγές της λιπάσης Humicola.

Οι ακόλουθοι μεταλλαγμένοι τύποι κατασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο όπως περιγράφηκε στο Παράδειγμα 3, εκτός από τη χρήση άλλων περιοριστικών ενζύμων για τη χώνευση του PCR-προϊόντος και ο φορέας χρησιμοποιήθηκε για την επανακλωνοποίηση του μεταλλαγμένου θραύσματος. Τα ονόματα των πλασμιδίων και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις τροποποιήσεις έχουν ως κατωτέρω.

45

	Όνομα πλασμιδίου	Αλληλουχία εκκινητή A
	pAHL254K	5'-GTGCGCAGGGATCTTCGGAATGTT-3'
	pAHL254R	5'-GTGCGCAGGGATTCTCGGAATGTT-3'
	pAHL242N	5'-GCCGCCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'
5	pAHL242N/D254N	5'-GTGCGCAGGGATGTTTCGGAATGTTAGGCTGGTTATTGCCG- CCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'
	pAHL87R	5'-CCCGATCCAGTTTCTTATCGATCGAGAGCCGCGG-3'
	pAHL87K	5'-CGATCCAGTTCTTTATCGATCGAGAGCCACGG-3'

10 Παράδειγμα 5: Κατασκευή των παραλλαγών λιπάσης μέσω συνδυασμού των διαθέσιμων μεταλλαγμένων τύπων:

Οι ακόλουθοι μεταλλαγμένοι τύποι κατασκευάστηκαν μέσω συνδυασμού των θραυσμάτων πλασμιδίου των μεταλλαγμένων τύπων που κατασκευάστηκαν ανωτέρω. Για παράδειγμα, ο pAHL87K/D254K κατασκευάστηκε μέσω απομόνωσης του τμήματος περιορισμού BamHI/BstXI από τον pAHL87K και την εισαγωγή του θραύσματος στον pAHL254K που χωνεύτηκε με BamHI και BstXI:

15 Πλασμίδιο  
pAHL87K/D254K  
pAHL87Q/D254N/D242N/E210Q  
pAHL87Q/D242N/E210Q  
20 pAHLR209A/E210A/D96L  
pAHLR209A/E210Q/E56Q  
pAHL210Q/D242N/D254N  
pAHL87Q/E210Q/D242N

25 Παράδειγμα 6:  
Μεταμόρφωση του Aspergillus oryzae (γενική διαδικασία)

Ενοφθαλμίστηκαν 100 χλστλ. YPD (Sherman et al., Methods in Yeasts Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) με σπόρια από *A. oryzae* και επώαστηκαν με ανακίνηση επί περίπου 24 ώρες. Το μυκήλιο συλλέχθηκε με διήθηση μέσω miracloth και ξεπλύθηκε με 200 χλστλ. 0,6 M MgSO<sub>4</sub>. Το μυκήλιο αιωρήθηκε εντός 15 χλστλ. από 1,2 M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, πεχά = 5,8. Το αιώρημα ψύχθηκε σε πάγο και προστέθηκε 1 χλστλ. ρυθμιστικού περιέχοντος 120 χλστγρ. από Novozym 234, φουρνιάς 1687. Μετά από 5 λεπτά, προστέθηκε 1 χλστλ. από 12 χλστγρ./χλστλ. BSA (Sigma τύπος H25) και η επώαση συνεχίστηκε με ήπια ανάδευση επί 1,5-2,5 ώρες στους 37°C ώσπου στο επιθεωρηθέν δείγμα στο μικροσκόπιο έγινε ορατός ένας μεγάλος αριθμός από πρωτοπλάστες.

35 Το αιώρημα διηθήθηκε μέσω miracloth, το διήθημα φέρθηκε σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και επικαλύφθηκε με 5 χλστλ. από 0,6 M σορβιτόλη, 100 mM Tris-HCl, πεχά = 7. Ετελέστηκε φυγοκέντρηση επί 15 λεπτά σε 1.000 g και οι πρωτοπλάστες συλλέχθηκαν από την κορυφή του προσκέφαλου MgSO<sub>4</sub>. Προστέθηκαν 2 όγκοι STC (1,2 M σορβιτόλη, 10 mM Tris-HCl, πεχά = 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) στο αιώρημα του πρωτοπλάστη και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε επί 5 λεπτά σε 1.000 g. Το σφαιρίο του πρωτοπλάστη επαναιωρήθηκε σε 3 χλστλ. STC και επανασφαιροποιήθηκε. Επαναλήφθηκε αυτή η διαδικασία. Τελικώς, οι πρωτοπλάστες επαναιωρήθηκαν σε 0,2-1 χλστλ. STC.

40 Αναμίχθηκαν 100 μ.λτ. από το αιώρημα του πρωτοπλάστη με 5-25 μ.γρ. p3SR2 (ένα γονίδιο amdS *A. nidulans* που φέρει το περιγραφόμενο πλασμίδιο υπό Hynes et al., Mol. and Cel. Biol., Vol. 3, No. 8, 1430-1439, Αύγουστος 1983) σε 10 μ.λτ. STC. Το μίγμα αφέθηκε στη θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ.) επί 25 λεπτά και προστέθηκαν και αναμίχθηκαν προσεκτικά (δύο φορές) 0,2 χλστλ. από PEG 4000 60% (BDH 29576), 10 mM CaCl<sub>2</sub> και 10 mM Tris-HCl, πεχά = 7,5 και τελικώς προστέθηκαν 0,85 χλστλ. του ίδιου διαλύματος και αναμίχθηκαν προσεκτικά. Το μίγμα αφέθηκε στη Θ.Δ. επί 25 λεπτά, περιδινήθηκε σε 2.500 g επί 15 λεπτά και το σφαιρίο επαναιωρήθηκε σε 2

χλωρίδ. σουρβιτόλης 1,2 M. Μετά από μία ακόμη κατακρήμνιση οι πρωτοπλάστες απλωθήκαν σε ελάχιστες πλάκες (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) περιέχουσες 1 M σουρβιτόλης, πεχά = 7, 10 mM ακεταμίδιο ως πηγή αζώτου και 20 mM CsCl προς αναστολή της ανάπτυξης υποβάθρου. Μετά από επώαση επί 4-7 ημέρες στους 37°C συλλέχθηκαν τα σπόρια, αιωρήθηκαν εντός στείρου ύδατος και απλώθηκαν σε μοναδικές αποικίες. Αυτή η μέθοδος επαναλήφθηκε και τα σπόρια μιας μοναδικής αποικίας αποθηκεύθηκαν μετά τη δεύτερη επανατομόνωση ως ένας προσδιορισμένος μεταμορφωμένος τύπος.

#### Παράδειγμα 7

##### Έκφραση της παραλλαγής λιπάσης D96L εντός *A. oryzae*

10 Ο pAHL96L μεταμορφώθηκε σε *A. oryzae* IFO 4177 μέσω συν-μεταμόρφωσης με p3SR2 περιέχοντα το γονίδιο *amdS* από τον *A. nidulans* όπως περιγράφεται στο Παράδειγμα 15. Οι παρασκευασθέντες ως ανωτέρω πρωτοπλάστες επωάστηκαν με ένα μίγμα από ίσες ποσότητες pAHL96L και p3SR2, με τη χρήση περίπου 5 μ.γρ. από το καθένα. Επανατομονώθηκαν δύο φορές 9 μεταμορφωμένοι τύποι οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιήσουν ακεταμίδιο ως μόνη πηγή αζώτου. Μετά την ανάπτυξη σε YPD επί τρεις ημέρες, τα υπερκείμενα καλλιέργειας αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό της δραστηριότητας λιπάσης όπως περιγράφεται στο Παράδειγμα 16 (Καθαρισμός των παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης). Ο καλύτερος μεταμορφωμένος τύπος επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτες και αναπτύχθηκε επί 4 ημέρες στους 30°C σε μια φιάλη ανακίνησης 1 λίτ. σε μέσο 200 χλστλ. FG4 (3% άλευρο σόγιας, 3% μάλτοδεξτρίνη, 1% πεπτόνη, το πεχά ρυθμίστηκε σε 7 με 4 M NaOH). Υπό αυτές τις συνθήκες ο μεταμορφωμένος τύπος απέδωσε περίπου 500 μονάδες λιπάσης ανά χλστλ. καλλιέργειας.

20 Οι άλλες παραλλαγές λιπάσης παρήχθησαν κυρίως όπως περιγράφηκε ανωτέρω, με τη χρήση της γενικής διαδικασίας που περιγράφηκε στο Παράδειγμα 6.

#### Παράδειγμα 8

##### Καθαρισμός των παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης

25 Προσδιορισμός της δραστηριότητας λιπάσης:

Παρασκευάστηκε ένα υπόστρωμα για λιπάση μέσω γαλακτωματοποίησης τριβουτυρικής γλυκερίνης (MERCK) με τη χρήση αραβικού κόμμεως ως γαλακτωματοποιητή.

Η δραστηριότητα της λιπάσης προσδιορίστηκε σε πεχά 7 με τη χρήση της μεθόδου στατ. πεχά. Ορίστηκε μια μονάδα δραστηριότητας λιπάσης (LU/χλστλ.) ως η αναγκαία ποσότητα για την απελευθέρωση ενός μ.Μολ λιπαρού οξέος ανά λεπτό.

30

Στάδιο 1: Φυγοκεντρείται το υπερκείμενο ζύμωσης, απορρίπτεται το ίζημα. Ρυθμίζεται το πεχά του υπερκείμενου σε 7 και προστίθεται σταδιακά ίσος όγκος ψυχρής αιθανόλης 96 %. Αφήνεται το μίγμα σε ηρεμία επί 30 λεπτά εντός παγολούτρου. Φυγοκεντρείται και απορρίπτεται το ίζημα.

35 Στάδιο 2: Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Διηθείται το υπερκείμενο και φέρεται σε στήλη ταχείας ροής DEAE (Pharmacia TM) ισορροπημένη με 50 mM τρις-οξικό ρυθμιστικό πεχά 7. Ξεπλένεται η στήλη με το ίδιο ρυθμιστικό μέχρι η απορρόφηση στα 280 nM να είναι μικρότερη από 0,05 OD. Εκλούεται η δεσμευμένη ενζυμική δραστηριότητα με γραμμική βαθμίδωση άλατος εντός του ίδιου ρυθμιστικού (0 έως 0,5 M NaCl) με τη χρήση όγκων πέντε στηλών. Συλλέγονται τα τμήματα που περιέχουν την ενζυμική δραστηριότητα.

40 Στάδιο 3: Υδροφοβή χρωματογραφία. Ρυθμίζεται η γραμμομοριακότητα της δεξαμενής που περιέχει την ενζυμική δραστηριότητα σε 0,8 M με προσθήκη στερεού οξικού αμμωνίου. Φέρεται το ένζυμο σε στήλη πηκτής TSK Butyl-Toyopearl 650 C (διαθέσιμη από την Tosoh Corporation Japan) η οποία εξισορροπήθηκε προκαταρκτικά με 0,8 M οξικό αμμώνιο. Ξεπλένεται το μη συνδεδεθέν υλικό με 0,8 M οξικού αμμωνίου και εκλούεται το δεσμευμένο υλικό με αποσταγμένο ύδωρ.

45 Στάδιο 4: Εκλούεται με ύδωρ η δεξαμενή που περιέχει τη δραστηριότητα λιπάσης προς ρύθμιση της αγωγιμότητας σε 2 mS και πεχά σε 7. Φέρεται η δεξαμενή σε στήλη σεφωύξης υψηλής απόδοσης Q (Pharmacia) εξισορροπημένης προκαταρκτικά με 50 mM τρις-οξικό ρυθμιστικό πεχά 7. Εκλούεται το δεσμευμένο ένζυμο με γραμμική βαθμίδωση άλατος.



Παράδειγμα 9

Απόδοση στο πλύσιμο των παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης

Η απόδοση στο πλύσιμο των παραλλαγών λιπάσης *Humicola lanuginosa* της εφεύρεσης εκτιμήθηκε με βίωση τη δουλολογία ενζύμου σε χλστγρ. πρωτεΐνης ανά λίτρο σύμφωνα με την OD<sub>280</sub> σε σύγκριση με τον άγριο τύπο λιπάσης *H. lanuginosa*.

Εκτελέστηκαν δοκιμές πλυσίματος σε ποτήρια ζέσεως των 150 χλστλτ. θερμοστατημένα εντός υδρολούτρου. Τα ποτήρια ζέσεως αναδεύτηκαν με τριγωνικές μαγνητικές ράβδους.

Οι πειραματικές συνθήκες ήταν ως κάτωθι:

Μέθοδος:	3 κύκλοι με ολονυκτία ξήρανση μεταξύ κάθε κύκλου
Υγρό πλυσίματος:	100 χλστλτ. ανά ποτήριο ζέσεως
Υφασμάτινο παρενθέμα:	6 παρενθέματα (3,5 X 3,5 cm) ανά ποτήριο ζέσεως
Υφασμα:	Βάμβακας 100%, Test Fabrics Style #400
Χρώση:	Χρωματισμένο λαρδί με ερυθρό του Σουδάν (0,75 χλστγρ. χρωστική/γρ. λαρδιού).
Εφαρμόστηκαν 6 μ.λτ. λαρδιού θερμανθέντος στους 70°C στο κέντρο κάθε παρενθέματος. Μετά την εφαρμογή της χρώσης, τα παρενθέματα θερμάνθηκαν σε φούρνο στους 75°C επί 30 λεπτά. Τα παρενθέματα ακολούθως αποθηκεύθηκαν ολονυκτίως στη Θ.Δ. πριν από το πρώτο ξέπλυμα.	
Απορρυπαντικό:	LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.) 1,17 γρ./λτ.
	AEO (Dobanol 25-7) 0,15 γρ./λτ.
	Τριφωσφορικό νάτριο 1,25 γρ./λτ.
	Θειικό νάτριο 1 γρ./λτ.
	Ανθρακινό νάτριο 0,45 γρ./λτ.
	Πυριτικό νάτριο 0,15 γρ./λτ.
Πεχά	10,2
Συγκέντρωση λιπάσης:	0,075, 0,188, 0,375, 0,75, και 2,5 χλστγρ. πρωτεϊνικής λιπάσης ανά λίτρο
Χρόνος:	20 λεπτά
Θερμοκρασία:	30°C
Πλύσιμο:	15 λεπτά σε τρεχούμενο πόσιμο νερό
Ξήρανση:	ολονυκτίως στη Θ.Δ. (περίπου στους 20°C, σχετ. υγρασία 30-50%)
Αξιολόγηση:	μετά το 3ο πλύσιμο, μετρήθηκε ο βαθμός ανάκλασης στα 460 nm.

Αποτελέσματα

Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης συγκρίθηκαν για τις παραλλαγές λιπάσης και της φυσικής λιπάσης *H. lanuginosa*. Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης υπολογίστηκαν με προσαρμογή των δεδομένων μέτρησης στην ακόλουθη εξίσωση:

$$\Delta R = \Delta R_{\mu\gamma} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (I)$$

όπου

το  $\Delta R$  είναι το εκφραζόμενο αποτέλεσμα σε μονάδες ανακλαστικότητας  
 το  $C$  είναι η συγκέντρωση του ενζύμου (χλστγρ/λτ.)  
 το  $\Delta R_{\mu\gamma}$  είναι μια σταθερά που εκφράζει το μέγιστο αποτέλεσμα  
 το  $K$  είναι μια σταθερά το  $K^2$  εκφράζει συγκέντρωση ενζύμου στην οποία λαμβάνεται το μισό του μεγίστου αποτελέσματος.



Υπολογίστηκαν οι παράγοντες βελτίωσης, με βάση τις χαρακτηριστικές σταθερές  $\Delta R_{\text{μεγ.}}$  και  $K$  που βρέθηκαν για κάθε παραλλαγή λιπάσης όπως επίσης και για τη λιπαρή άγριου τύπου. Ο παράγοντας βελτίωσης, ορίζεται ως εξής

$$f_{\text{βελτιωσης}} = C_{\text{WT}}/C \quad (\text{II})$$

εκφράζει την ποσότητα πρωτεΐνης της παραλλαγής λιπάσης που χρειάζεται για τη λήψη του ίδιου αποτελέσματος όπως αυτό ελήφθη με 0,25 χλστγρ./λι. με αναφορά στην πρωτεΐνη άγριου τύπου ( $C_{\text{WT}}$ ).

Έτσι, η διαδικασία για τον υπολογισμό του παράγοντα βελτίωσης είναι ως ακολούθως:

1) Το αποτέλεσμα της πρωτεΐνης άγριου τύπου στα 0,25 χλστγρ./λι. ( $\Delta R_{\text{άγριος τύπος}}$ ) υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης (I).

2) η συγκέντρωση της παραλλαγής λιπάσης που προκύπτει από το ίδιο αποτέλεσμα όπως αυτή του άγριου τύπου στα 0,25 χλστγρ./λι. υπολογίστηκε με τη βοήθεια της ακόλουθης εξίσωσης:

$$C = \left( K_{(\text{παραλλαγή})} \frac{\Delta R_{\text{άγριος τύπος}}}{\Delta R_{\text{μεγ. (παραλλαγή)}} - \Delta R_{(\text{άγριος τύπος})}} \right)^2 \quad (\text{III})$$

3) ο παράγοντας βελτίωσης υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης (II).

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον ακόλουθο Πίνακα I

Πίνακας I

	Παραλλαγή	Παράγοντας βελτίωσης
25	D96L	4,4
	D111L	1
	E87A	1
30	E56A	1,6
	E56Q	2,6
	R209A	1,1
	D242N	1,7
	R209A + E210A	1,9
	R209A + E210A + D96L	2,8
35	E210Q + D242N + D254N	1,8
	R209A + E210A + D96L + E56Q	1,5

Από τον Πίνακα I φαίνεται ότι οι παραλλαγές λιπάσης R209A + E210A, E56Q και D96L έχουν μια σημαντικά καλύτερη απόδοση πλυσίματος από την λιπαρή άγριου τύπου. Αυτό πιθανώς να αιτιολογείται στο μειωμένο αρνητικό φορτίο και στην αυξημένη υδροφοβία αυτών των παραλλαγών που προκύπτει από την αυξημένη απορρόφηση κατά τη διάρκεια του πλυσίματος και συνεπώς υψηλότερη δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της φάσης του στεγνώματος. Η απόδοση των παραλλαγών λιπάσης E87A, D111L και R209A είναι ίση με αυτή του ενζύμου άγριου τύπου.

Παράδειγμα 10

Αυξημένη θερμοκή ευστάθεια των παραλλαγών λιπάσης

Η θερμοκή ευστάθεια των επιλεγμένων παραλλαγών της λιπάσης *H. lanuginosa* έχει εξεταστεί με Διαφορική Θερμοδομετρία Σάρωσης (DSC). Με τη χρήση αυτής της τεχνικής, η θερμοκρασία θερμοκής μετουσίωσης, Td, καθορίζεται με θέρμανση ενός διαλύματος ενζύμου σε σταθερά προγραμματισμένο ρυθμό.

Πειράματα:

Για τις έρευνες χρησιμοποιήθηκε ο Θερμοδομετρητής Διαφορικής Σάρωσης MC-2D από την MicroCal Inc. Παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα 50 mM στις ακόλουθες τιμές πεχά: 4 (οξικό), 7 (TRIS-οξικό), 10 (γλυκίνη). Η σύγκέντρωση του ενζύμου κυμαινόταν από 0,6 έως 0,9 χλστgr./χλστλτ., και μια συνολική ποσότητα χρησιμοποιήθηκε από περίπου 1,2 χλστλτ. για κάθε πείραμα. Όλα τα δείγματα θερμάνθηκαν από 5°C έως 95°C με ένα ρυθμό σάρωσης 90°C/ώρα.

Αποτελέσματα:

Τα αποτελέσματα για τον άγριο τύπο και τους επιλεγμένους μεταλλαγμένους τύπους απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Αρ.	Μετάλλαξη	πεχά 4		πεχά 7		πεχά 10	
		Td	dTd	Td	dTd	Td	dTd
WT	-	58,9	-	74,7	-	69,3	-
1	F211A	60,2	+1,3	75,8	+1,1	70,3	+1
2	T267R	59,4	+0,5	75,7	+1	70	+0,7
3	D111N	58,3	-0,6	75,6	+0,9	69,9	+0,6
4	F211L	57,8	-1,1	74,8	0,1	69,4	0,1

Σημείωση: το dTd υποδηλώνει την αλλαγή στη θερμοκή ευστάθεια ως αποτέλεσμα της μεταλλαγής.

Παράδειγμα 11

Σταθερότητα κατά την αποθήκευση των παραλλαγών λιπάσης *H. lanuginosa* εντός υγρού απορρυπαντικού  
Δοκιμάστηκαν μερικές παραλλαγές εντός πρότυπου υγρού απορρυπαντικού με την ακόλουθη σύνθεση:

		% w/w
Ανιοντικός	LAS	10
	AS	1
	Σάπωνας	14
Μη ιοντικός	AEO	13
	1,2-προπανοδιόλη	3
	Αιθανόλη	5
Ρυθμιστικό	TEA	6
Σώμα	κιτρικό νάτριο	1
Μέσο εξουδετέρωσης	NaOH	2
Σταθεροποιητής κτ.λ.	SXS	1
	Ca <sup>2+</sup>	0,0025
	φωσφονικά	0,4
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
Υδωρ	προστιθέμενο έως 100%	
Πεχά	8 ή 10	

Προστέθηκαν 1.000 LU/γρ. απορρυπαντικού και σε μερικά δείγματα προστέθηκαν 0,25 AU/γρ. (Alcalase<sup>®</sup>). Για δείγματα αποθηκεύτηκαν σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα (το καθένα εις τριπλούν)

5	Θερμοκρασία αποθήκευσης:	-18°C	30°C
5	Απορρυπαντικό		
	πεχά 8, χωρίς πρωτεάση	2 & 7 ημέρες	2 & 7 ημέρες
	πεχά 8, 0,025 AU/γρ.		2 ημέρες
	πεχά 10, χωρίς πρωτεάση	7 ημέρες	7 ημέρες

10 Εφαρμόζοντας αυτή την επώαση τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο LU (Novo Nordisk AF 95,5). Υποθέτοντας ότι η διάσπαση της δραστηριότητας λιπάσης ακολουθεί μια κινητική αντίδρασης πρώτης τάξης, η σταθερά της ταχύτητας διάσπασης μπορεί να προσδιοριστεί ως εξής:

$$15 \quad A(t) = A_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

το  $A(t)$  είναι η δραστηριότητα ενζύμου σε χρόνο  $t$ , το  $A_0$  είναι η αρχική δραστηριότητα και το  $k$  η σταθερά ταχύτητας αντίδρασης πρώτης τάξης.

Για το απορρυπαντικό που περιλαμβάνει πρωτεάση μπορεί να υπολογιστεί μια σταθερά ταχύτητας για την πρωτεόλυση από τη σχέση

$$20 \quad A(t) = A_0 \cdot \exp(-[k + k_p] \cdot t)$$

όπου το  $k_p$  είναι η σταθερά ταχύτητας της πρωτεόλυσης, και όπου το  $k$  υπολογίζεται από τα δεδομένα σταθερότητας που προσδιορίστηκαν για το απορρυπαντικό χωρίς πρωτεάση.

25 Σε κάθε πείραμα, η λιπάση άγριου τύπου H. lanuginosa περιελήφθει ως αναφορά, και η σύγκριση των παραλλαγών με αυτές του άγριου τύπου έγιναν μόνο εντός του πειράματος για να μειωθεί η αβεβαιότητα της διακύμανσης ανάμεσα στα πειράματα.

Ακολουθώς παρέχονται τα αποτελέσματα, και η σχετική βελτίωση μιας παραλλαγής έναντι του άγριου τύπου ως εξής:

$$30 \quad IF_x = k_{w_i} / k_x$$

όπου το  $IF$  σημαίνει Παράγοντας βελτίωσης, το  $k_{w_i}$  είναι η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του άγριου τύπου (σε δεδομένες συνθήκες) και το  $k_x$  είναι η αντίστοιχη σταθερά ταχύτητας της εξεταζόμενης παραλλαγής στο ίδιο πείραμα.

35 Το  $IF$  εκφράζει τη σχετική βελτίωση στο χρόνο ημιζωής (το  $IF_x = 2$  υποδηλώνει ότι ο χρόνος ημιζωής της παραλλαγής  $x$  είναι διπλάσιος από αυτόν του άγριου τύπου στο ίδιο πείραμα).

Με βάση μια εκτίμηση των διακυμάνσεων των αντιγράφων σε ένα πείραμα το  $IF < 0,7$  ή  $IF > 1,3$  θεωρείται σημαντικό.

40 Η μονάδα του  $k_z$  είναι (ημέρα)<sup>-1</sup>.

45

	Παραλλαγή	αφ. Πειράματος	πεχή 8	πεχή 8		πεχή 10	
			χωρίς πρωτ. k <sup>*)</sup> IF <sup>*)</sup>	k <sub>p</sub>	IF	k <sub>p</sub>	IF
5	Άγριος τύπος	3	0,02	0,48		0,19	
		5	0,02	0,40		0,16	
		6	0,00	0,34		0,09	
		7	0,01	0,52		0,22	
		8	0,01	0,50		0,09	
10		a	0,01	0,52		0,07	
		b	0,01	0,52		0,07	
15	D96N	3	0,00	0,21	2,3	0,15	1,3
		5	0,02	0,26	1,6	n.d.	
	D111N	3	0,00	0,50	1	0,16	1,2
		5	0,02	0,31	1,3	0,13	1,2
	E56Q	3	0,01	0,22	2,2	0,14	1,4
		6	0,01	0,17	2	0,08	1,2
	D96L	7	0,00	0,23	2,3	0,09	2,6
		7	0,02	0,36	1,4	0,10	2,3
	R209A/E210A/D96L	7	0,02	0,36	1,4	0,10	2,3
		7	0,02	0,49	1	n.d.	
20	E210Q/D242N/D254N	7	0,02	0,49	1	n.d.	
		7	0,02	0,49	1	n.d.	

Στο απορρυπαντικό σε πεχή 8 το <sup>\*)</sup>κ είναι σε όλες τις περιπτώσεις πολύ μικρό, και λόγω του σύντομου χρόνου αποθήκευσης (7 ημέρες, περίπου το 90% της παραμένουσας δραστητικότητας) δεν προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια. Έτσι το IF δεν υπολογίστηκε.

25

Συμπερασματικά ένας αριθμός των ελεγχθέντων παραλλαγών έχει βελτιωμένη αντοχή στην πρωτεολυτική αποδόμηση, και σχεδόν όλες είχαν βελτιωμένη αντοχή σε αλκαλικές συνθήκες.

#### Παράδειγμα 12

30

#### Ειδική δραστητικότητα

Για τις ακόλουθως δεικνύμενες παραλλαγές λιπάσης μετρήθηκε μια μεγαλύτερη ειδική δραστητικότητα (ποσότητες διασπώμενων μορίων υποστρώματος ανά μονάδα χρόνου ανά μονάδα ποσότητας) συγκριτικά με τον άγριο τύπο (wt). Αυτό σημαίνει ότι αυτές οι λιπάσες έχουν μια ανώτερη απόδοση υδρόλυσης του πραγματικού υποστρώματος.

35

Οι λιπάσες ζυμώθηκαν και καθαρίστηκαν με τον ίδιο τρόπο. Οι καθαρισμένες λιπάσες ελέγχθηκαν με ένα τυπικό προσδιορισμό LU (Αναλυτική μέθοδος, εσωτερικός αριθμός NOVO NORDISK AF 95/6-GB 1991,02.07). Το δείγμα αναλύθηκε δύο φορές, και οι μέσες τιμές καταχωρήκαν σε πίνακα. Η ποσότητα της πρωτεΐνης εκτιμήθηκε με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο Shimadzu, χρησιμοποιώντας μήκος κύματος 280 nm. Το δείγμα θεωρήθηκε καθαρό όταν η αναλογική τιμή του OD280 διαιρούμενη δια του OD260 ήταν μεγαλύτερη από 1,6, μαζί με μια μόνη ζώνη ηλεκτροφόρησης πηκτής SDS πολυακρυμιδίου.

40

Humicola lanuginosa

Ειδική δραστητικότητα LU/OD280

D111N

4290\*

E56A

4890\*

L206V

4750

45

R209\*/E210\*

6686

R209A/E210A/D96L

4818

wt

3790

\*δοκιμάστηκαν μόνο άπαξ.

ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

- (1) ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ:
- 5 (i) ΚΑΤΑΧΩΡΗΤΗΣ: Novo Nordisk A/S  
(ii) ΤΙΤΛΟΣ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ: Παράλλαγές λιπαρίας  
(iii) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ: 2  
(iv) ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑΣ:  
(A) ΠΑΡΑΛΗΠΤΗΣ: Novo Nordisk A/S  
10 (B) ΟΔΟΣ: Novo Alle  
(C) ΠΟΛΗ: Bagsvaerd  
(E) ΧΩΡΑ: Δανία  
(F) ΤΑΧ. ΚΩΔΙΚΑΣ: 2880
- 15 (v) ΑΝΑΓΝΩΣΙΜΗ ΜΟΡΦΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ:  
(A) ΤΥΠΟΣ ΜΕΣΟΥ: Δισκέτα floppy  
(B) ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ: IBM PC συμβατός  
(C) ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: PC-DOS/MS-DOS  
(D) ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: Patent In Release #1.0, Version #1.25  
20
- (vi) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΡΕΧΟΥΣΑΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:  
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:  
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:  
(C) ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ:  
25
- (vii) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:  
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: DK 2196/90  
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 13 ΣΕΠ. 1990  
30
- (vii) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:  
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: DK 2194/90  
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 13 ΣΕΠ. 1990  
35
- (vii) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:  
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: DK 2195/90  
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 13 ΣΕΠ. 1990  
40
- (viii) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ ΔΙΚΗΓΟΡΟΥ/ΠΡΑΚΤΟΡΑ  
(A) ΟΝΟΜΑ: Thalsøe-Madsen, Birgit  
(C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΗΣ/ΣΥΝΟΨΗΣ: 3520,204-WO  
45
- (ix) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΤΗΛΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ:  
(A) ΤΗΛΕΦΩΝΟ: +45 4444 8888  
(B) TELEFAX: +45 4449 3256  
(C) TELEX: 37304



290

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ SEQ ID NO: 2:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 291 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πρωτεΐνη

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: SEQ ID NO: 2:

Met	Arg	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Phe	Phe	Val	Ser	Ala	Trp	Thr	Ala	Leu
1				5					10					15	
Ala	Ser	Pro	Ile	Arg	Arg	Glu	Val	Ser	Gln	Asp	Leu	Phe	Asn	Gln	Phe
			20					25					30		
Asn	Leu	Phe	Ala	Gln	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ala	Tyr	Cys	Gly	Lys	Asn	Asn
		35					40					45			
Asp	Ala	Pro	Ala	Gly	Thr	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Ala	Cys	Pro
	50					55					60				
Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Phe	Glu	Asp	Ser
65					70					75					80
Gly	Val	Gly	Asp	Val	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Leu	Asp	Asn	Thr	Asn	Lys
				85					90					95	
Leu	Ile	Val	Leu	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Ile	Glu	Asn	Trp	Ile
			100					105					110		
Gly	Asn	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Lys	Glu	Ile	Asn	Asp	Ile	Cys	Ser	Gly
		115					120					125			
Cys	Arg	Gly	His	Asp	Gly	Phe	Thr	Ser	Ser	Trp	Arg	Ser	Val	Ala	Asp
	130					135					140				
Thr	Leu	Arg	Gln	Lys	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Arg	Glu	His	Pro	Asp	Tyr
145					150					155					160
Arg	Val	Val	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val
				165					170					175	
Ala	Gly	Ala	Asp	Leu	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Asp	Val	Phe	Ser

	180		185		190										
Tyr	Gly	Ala	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Phe	Leu	Thr
		195					200					205			
Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	His	Thr	Asn	Asp	Ile
	210					215					220				
Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	Ser	Pro
225					230					235					240
Glu	Tyr	Trp	Ile	Lys	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Thr	Arg	Asn	Asp
				245					250					255	
Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro
			260					265					270		
Asn	Ile	Pro	Asp	Ile	Pro	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ile	Gly
		275					280					285			
Thr	Cys	Leu													
	290														

EP/15153

ΑΞΙΩΣΕΙΣ

5 1. Μια ενζυματικώς δραστική παραλλαγή λιπάσης από μια γονική λιπάση η οποία γονική λιπάση περιλαμβάνει μια καταλυτική τριάδα δίκην Θρυψίνης περιλαμβάνουσα μια δραστική σερίνη κείμενη σε ένα και' εξοχήν υδρόφοβο, επιμήκη θύλακα σύνδεσης του μορίου της λιπάσης, και περιλαμβάνουσα μια επιφανειακή δομή βρόχου η οποία καλύπτει την ενεργή σερίνη όταν η λιπάση βρίσκεται σε ανενεργή μορφή, η οποία επιφανειακή δομή βρόχου μετατοπίζεται προς έκθεση των καταλοίπων ενεργών κέντρων όταν η λιπάση ενεργοποιείται μέσω αυτών δημιουργώντας μια λιπιδική ζώνη επαφής κείμενη στο τμήμα της δομής λιπάσης που περιέχει το ενεργό κατάλοιπο σερίνης που συνίσταται από μια επιφάνεια με αυξημένο επιφανειακό υδρόφοβο χαρακτήρι (υδροφοβία) η οποία αλληλαντιδρά με το λιπιδικό υπόστρωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης, όπου το ηλεκτροστατικό φορτίο ή/και η υδροφοβία της λιπιδικής ζώνης επαφής έχει μεταβληθεί μέσω εξάλειψης ή αντικατάστασης ενός ή περισσότερων αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων αμινοξέων της λιπιδικής ζώνης επαφής μέσω ουδέτερου ή θετικά φορτισμένου καταλοίπου (-ων) αμινοξέων, ή/και μέσω της αντικατάστασης ενός ή περισσότερων ουδέτερων κατά-  
10 λοιπων αμινοξέων με θετικώς φορτισμένο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, ή/και με εξάλειψη ή αντικατάσταση ενός ή περισσότερων υδρόφιλων καταλοίπων αμινοξέων με υδρόφοβο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, υπό τον όρο ότι η ρηθείσα παραλλαγή λιπάσης είναι διαφορετική από τις παραλλαγές μιας τέτοιας γονικής λιπάσης απομονώσιμη από τον *Pseudomonas putida* ATCC 53552, στην οποία το Gln στη θέση 127 έχει αντικατασταθεί με Arg ή/και το κατά-  
15 λοιπο Phec στη θέση 207 έχει αντικατασταθεί με Thr, Gly, Lys ή Ala.

2. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 1, όπου ένα ή περισσότερα κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος ή ασπαρτικού οξέος της ρηθείσας λιπιδικής ζώνης επαφής έχουν αντικατασταθεί με γλουταμίνη, ασπαραγίνη, αλανίνη, λευκίνη, βαλίνη, σερίνη, θρεονίνη, λυσίνη ή αργινίνη.  
25

3. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 1 ή 2, όπου η γονική λιπάση είναι μια μικροβιακή λιπάση.

4. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 3, όπου η γονική λιπάση είναι μια μυκητιακή λιπάση, κατά προτίμηση εξαγόμενη από ένα στέλεχος του *Humicola* ή *Rhizomucor*.  
30

5. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 4, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση *Rhizomucor miehei*.

6. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 5, όπου ένα ή περισσότερα κατάλοιπα αμινοξέα αντικαθίστανται ως ακολούθως:  
35

D91N,K,R,A,V,L,S,T·  
D256N,K,R,A,V,L,S,T·  
D226N,K,R,A,V,L,S,T·  
40 D61N,K,R,A,V,L,S,T·  
D113N,K,R,A,V,L,S,T·  
E201Q,K,R,A,V,L,S,T· ή  
D243N,K,R,A,V,L,S,T.

7. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 4, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση *Humicola lanuginosa*.  
45

8. Μια παραλλαγή λιπασης σύμφωνα με την αξίωση 7, όπου ένα ή περισσότερα κατάλοιπα αμινοξέων αντικαθίστανται ως ακολούθως:

- 5 E87Q,K,R,A,N,T,S,L,V·  
D254N,K,R,A,Q,T,S,L,V·  
D242N,K,R,A,Q,T,S,L,V·  
E210Q,K,R,A,N,T,S,L,V·  
E56Q,K,R,A,N,T,S,L,V·  
D96N,K,R,A,Q,T,S,L,V·  
10 D111N,K,R,A,Q,T,S,L,V·  
D62A,Q,N,T,S,K,R,L,V·  
E219A,Q,N,T,S,K,R,L,V·  
E234A,Q,N,T,S,K,R,L,V·  
E57A,Q,N,T,S,K,R,L,V·  
15 E99A,Q,N,T,S,K,R,L,V·  
D27A,Q,N,T,S,K,R,L,V·  
E239A,Q,N,T,S,K,R,L,V·  
  
20 T267K,R·  
S85K,R·  
T226K,R·  
N88K,R·  
N92K,R·  
I255K,R·  
25 I202K,R·  
L206K,R·  
R209A·  
L259K,R·  
V203K,R· ή  
30 L227K,R· ειδικότερα μια παραλλαγή λιπάσης περιλαμβάνονται τις ακόλουθες αντικαταστάσεις:
- E87Q + D254N + D242N + E210Q·  
E87Q + D254N + E210Q·  
D96N + E87Q + D254N·  
35 R209A + E210A·  
R209A + R210A + D96L· ή  
E210Q + D242N + D254N

40 9. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 3, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση ζυμομύκητα, π.χ. εξαγόμενη από ένα στέλεχος *Candida*, ή μια βακτηριακή λιπάση, π.χ. εξαγόμενη από ένα στέλεχος *Pseudomonas*.

10. Μια δομή DNA περιλαμβάνουσα μια αλληλουχία DNA κωδικοποιούσα μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με οποιαδήποτε των αξιώσεων 1-9.

45 11. Ένας ανασυνδυασμένος φορέας έκφρασης ο οποίος φέρει μια δομή DNA σύμφωνα με την αξίωση 10.

12. Ένα κύτταρο το οποίο μεταμορφώνεται με μια δομή DNA σύμφωνα με την αξίωση 33 ή ένα φορέα σύμφωνα με την αξίωση 11.

5 13. Ένα κύτταρο σύμφωνα με τη αξίωση 12 το οποίο είναι ένα μυκητιακό κύτταρο, π.χ. ανήκον στο γένος *Aspergillus*, όπως *A. niger*, *A. oryzae*, ή *A. nidulans*; ένα κύτταρο ζυμομύκητα, π.χ. ανήκον σε ένα στέλεχος *Saccharomyces*, όπως *S. cerevisiae*, ή ένα μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα από το γένος *Hansenula*, όπως *H. polymorpha*, ή *Phichia*, όπως *P. pastoris*; ή ένα βακτηριακό κύτταρο, π.χ. που ανήκει σε ένα στέλεχος *Bacillus*, όπως *B. subtilis*, ή *B. lentus*.

10 14. Ένα κύτταρο σύμφωνα με την αξίωση 12 το οποίο είναι ένα φυτικό κύτταρο, π.χ. που ανήκει στα *Solanaceae*, όπως *Solanum tuberosum*, ή *Nicotiana tabacum*.

15 15. Μια μέθοδος παραγωγής μιας παραλλαγής λιπάσης σύμφωνα με οποιαδήποτε των αξιώσεων 1-9, όπου ένα κύτταρο σύμφωνα με οποιαδήποτε των αξιώσεων 12-14 καλλιεργείται ή αναπτύσσεται υπό συνθήκες αγωγίμες στην παραγωγή της παραλλαγής λιπάσης, και επομένως η παραλλαγή λιπάσης ανακτάται από την καλλιέργεια ή το φυτό.

20 16. Ένα απορρυπαντικό πρόσθετο περιέχον μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις αξιώσεις 1-9, και/ή επιλογή με τη μορφή μη κονιώδους κόκκου, σταθεροποιημένου υγρού ή προσστατευμένου ενζύμου.

17. Ένα απορρυπαντικό πρόσθετο σύμφωνα με την αξίωση 16 το οποίο περιλαμβάνει 0.02-200 χλστγρ. ενζυμικής πρωτεΐνης/γρ. του πρόσθετου.

25 18. Ένα απορρυπαντικό πρόσθετο σύμφωνα με την αξίωση 16 ή 17 το οποίο επιπροσθέτως περιέχει ένα άλλο ένζυμο όπως μια πρωτεάση, αμυλάση, υπεροξειδάση ή/και κυταρινάση.

19. Μια απορρυπαντική σύνθεση περιέχουσα μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με οποιαδήποτε των αξιώσεων 1-9.

30 20. Μια απορρυπαντική σύνθεση σύμφωνα με την αξίωση 19 η οποία επιπροσθέτως περιέχει ένα άλλο ένζυμο όπως μια πρωτεάση, αμυλάση, υπεροξειδάση ή/και κυταρινάση.



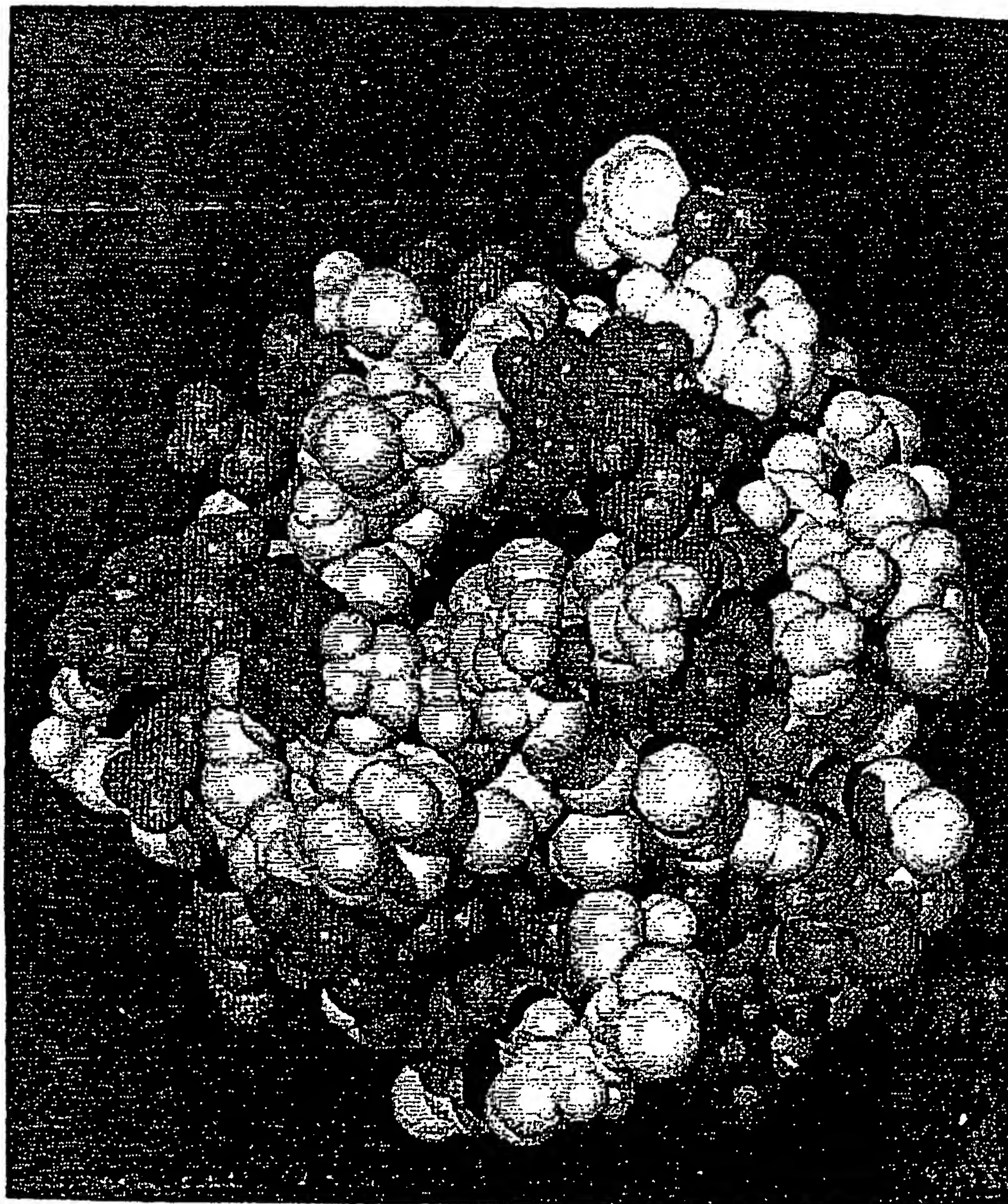
EP/15153

## ΤΙΤΛΟΣ

### Παραλλαγές λιπάσης

#### Περίληψη

Οι λιπάσες που περιέχουν μια δίκην θρυψίνης καταλυτική τριάδα περιλαμβάνουσα μια ενεργή σερίνη κείμενη σε ένα κατ' εξοχήν υδρόφοβο, επιμήκη θύλακα σύνδεσης του μορίου της λιπάσης, ο οποίος θύλακας αποτελεί μέρος της και περιβάλλεται από μια λιπιδική ζώνη επαφής, μεταλλάσσονται μέσω εξάλειψης ή αντικατάστασης ενός ή περισσότερων καταλοίπων αμινοξέων στη λιπιδική ζώνη επαφής έτσι ώστε να μεταβάλλεται το ηλεκτροστατικό φορτίο ή/και ο υδρόφοβος χαρακτήρας της λιπιδικής ζώνης επαφής, ή έτσι ώστε να μεταβάλλεται η επιφανειακή συμμορφία της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιπάσης.



Elx. 1a

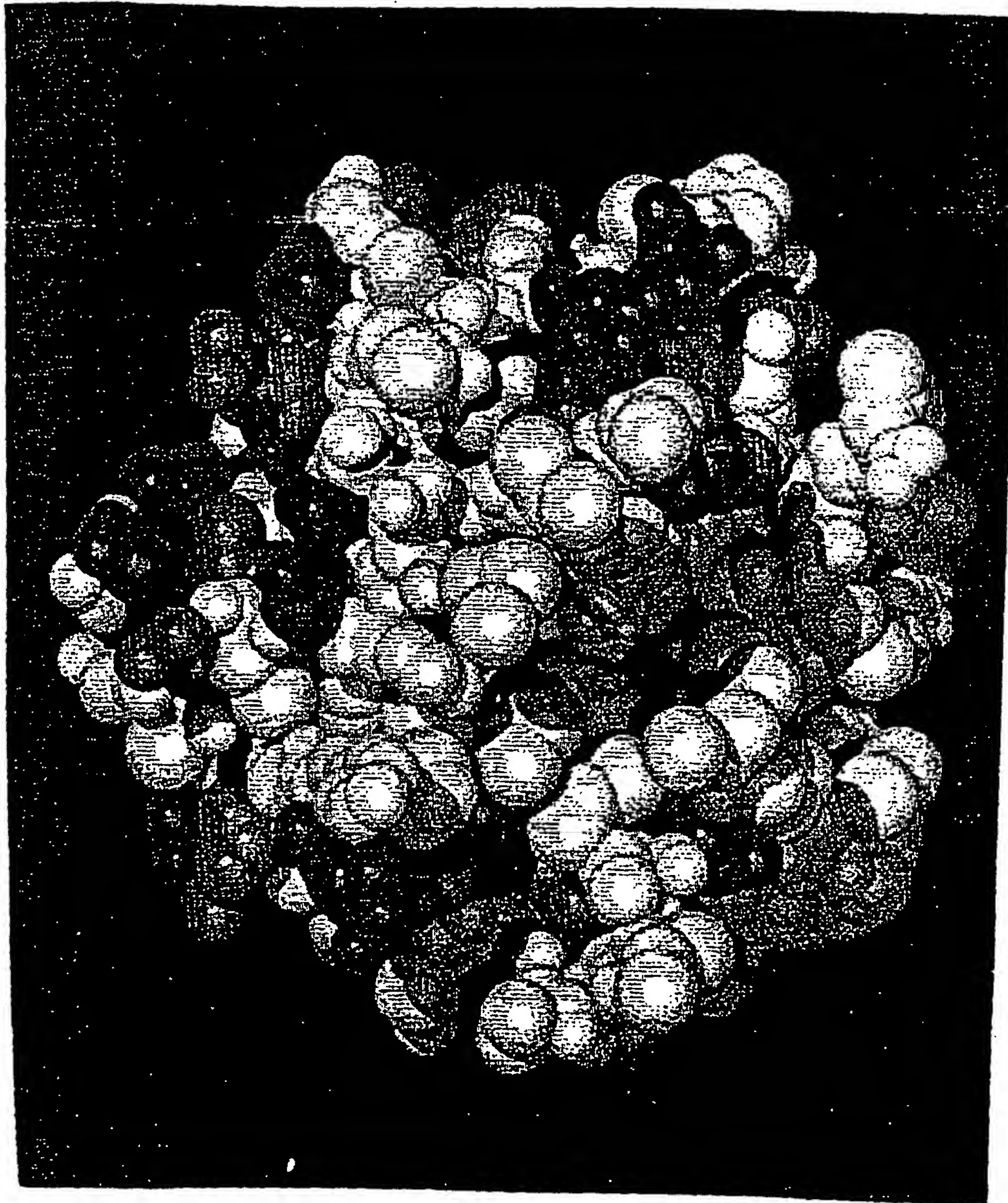


Fig. 1β



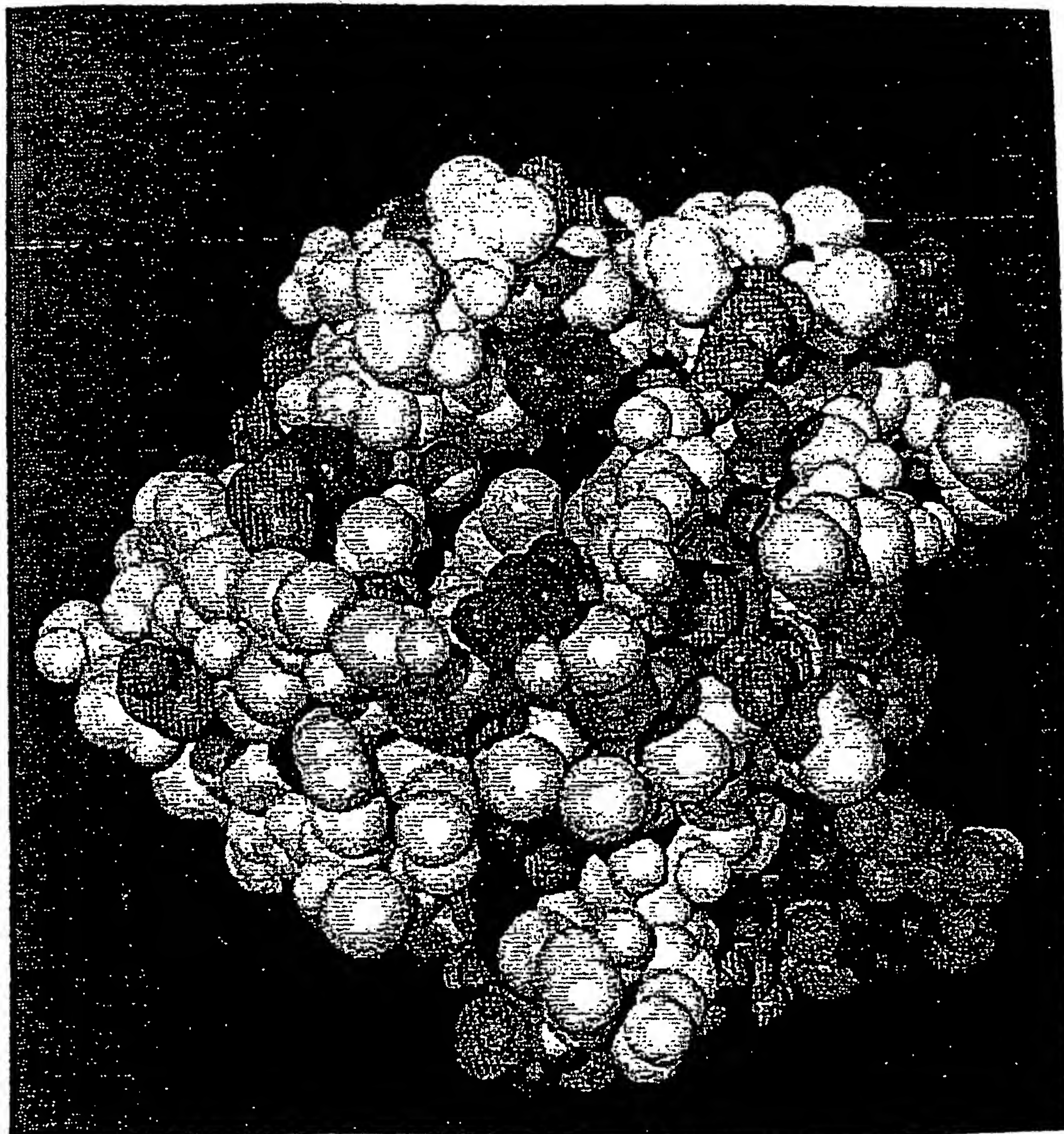


Fig. 2a

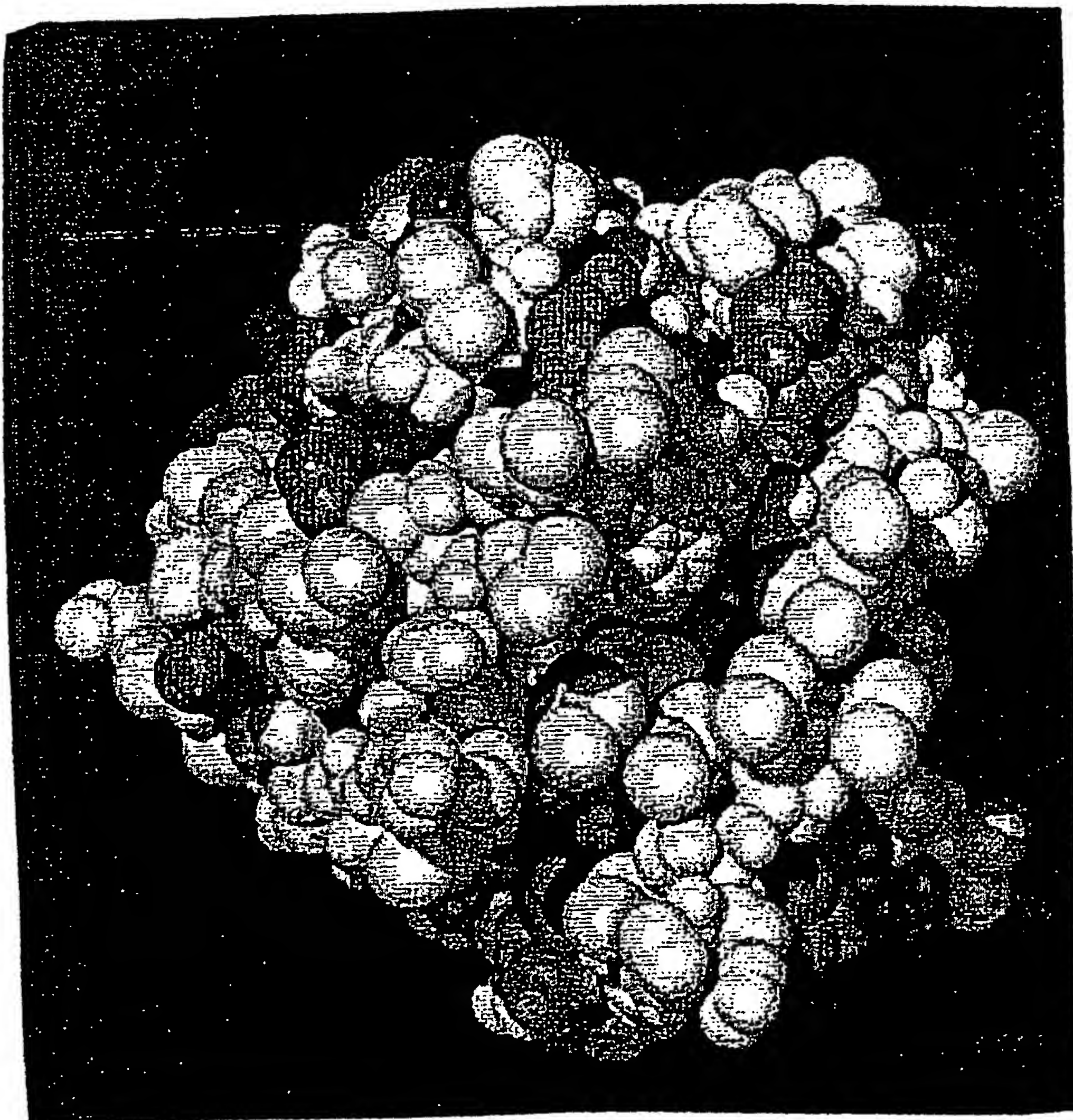
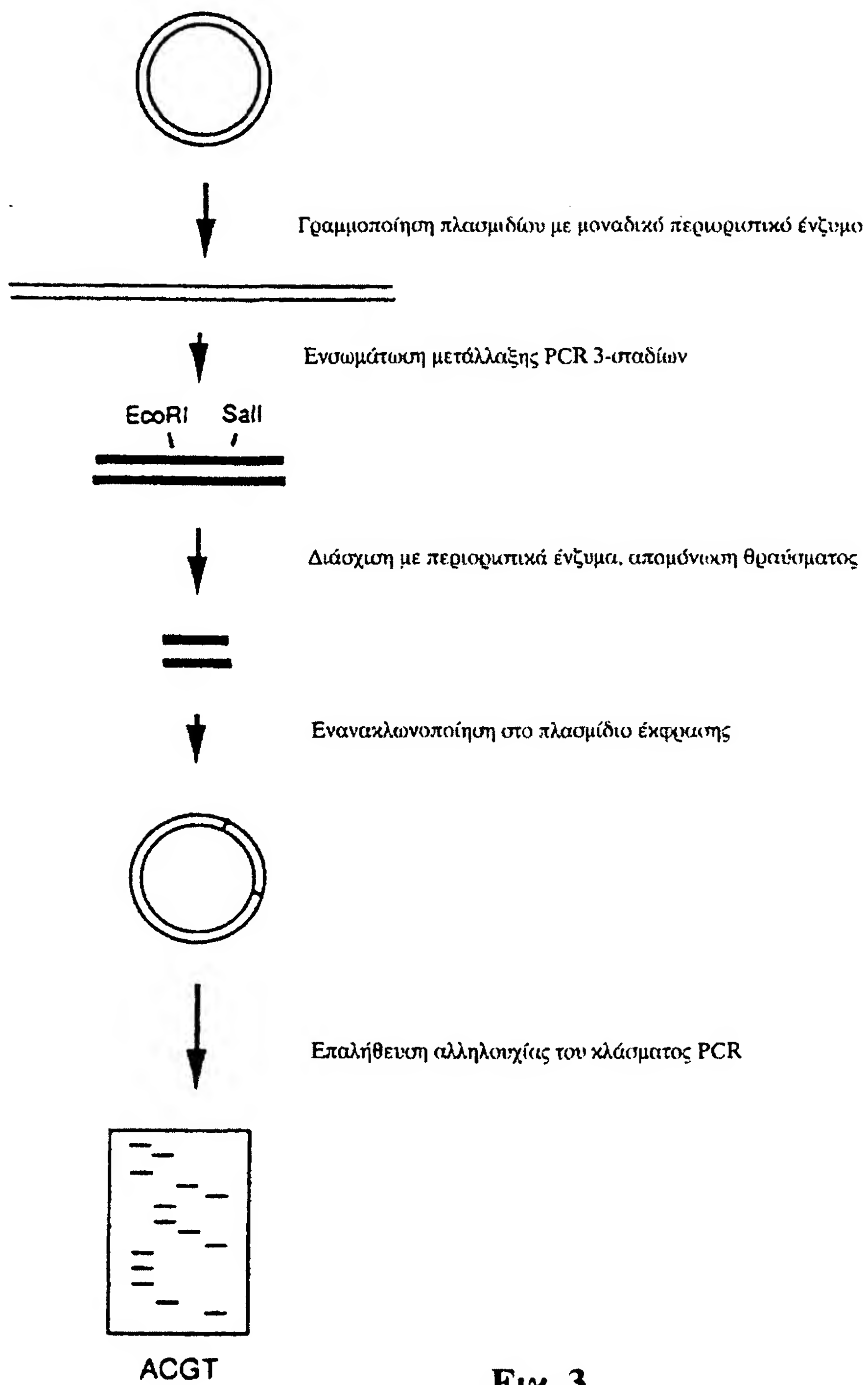
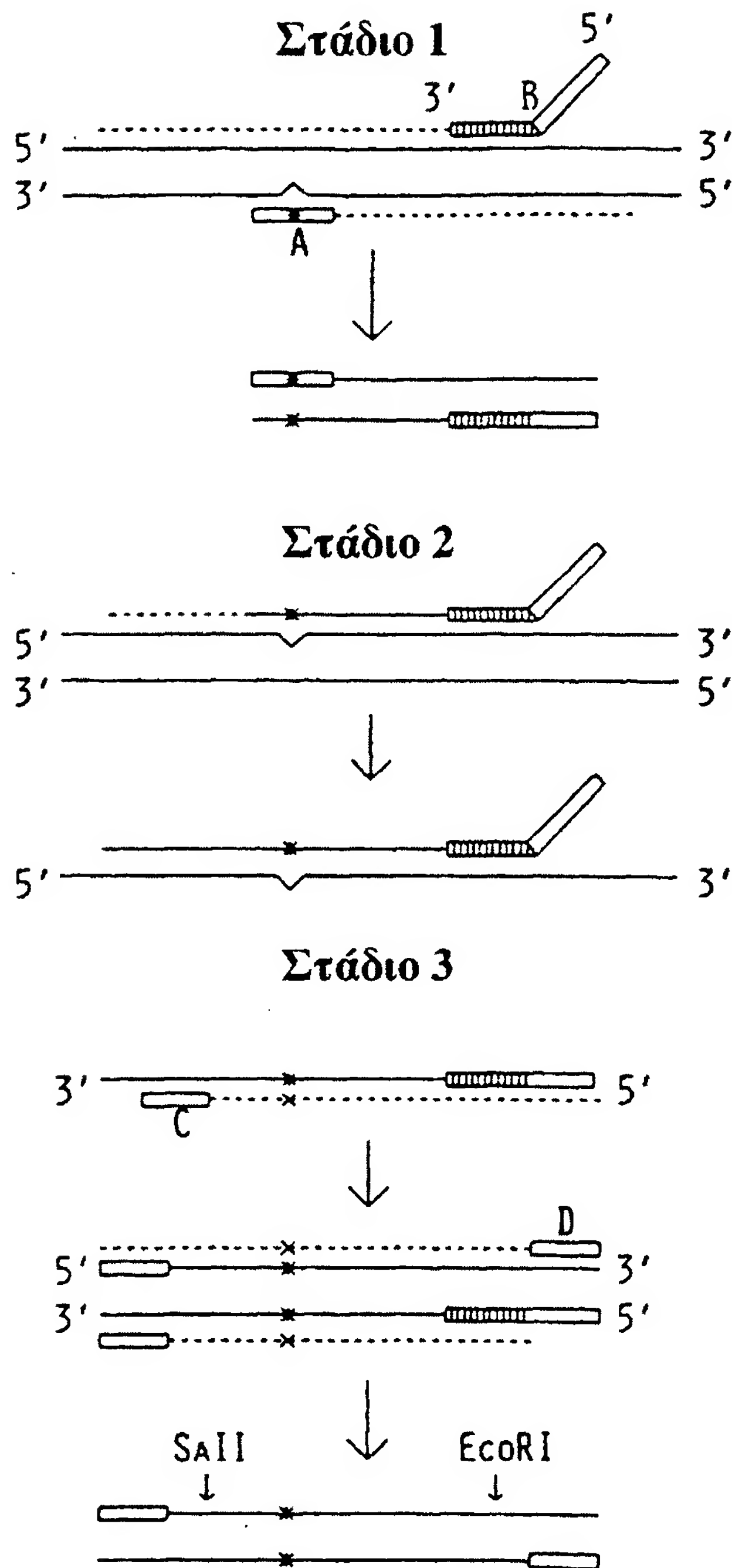


Fig. 2β

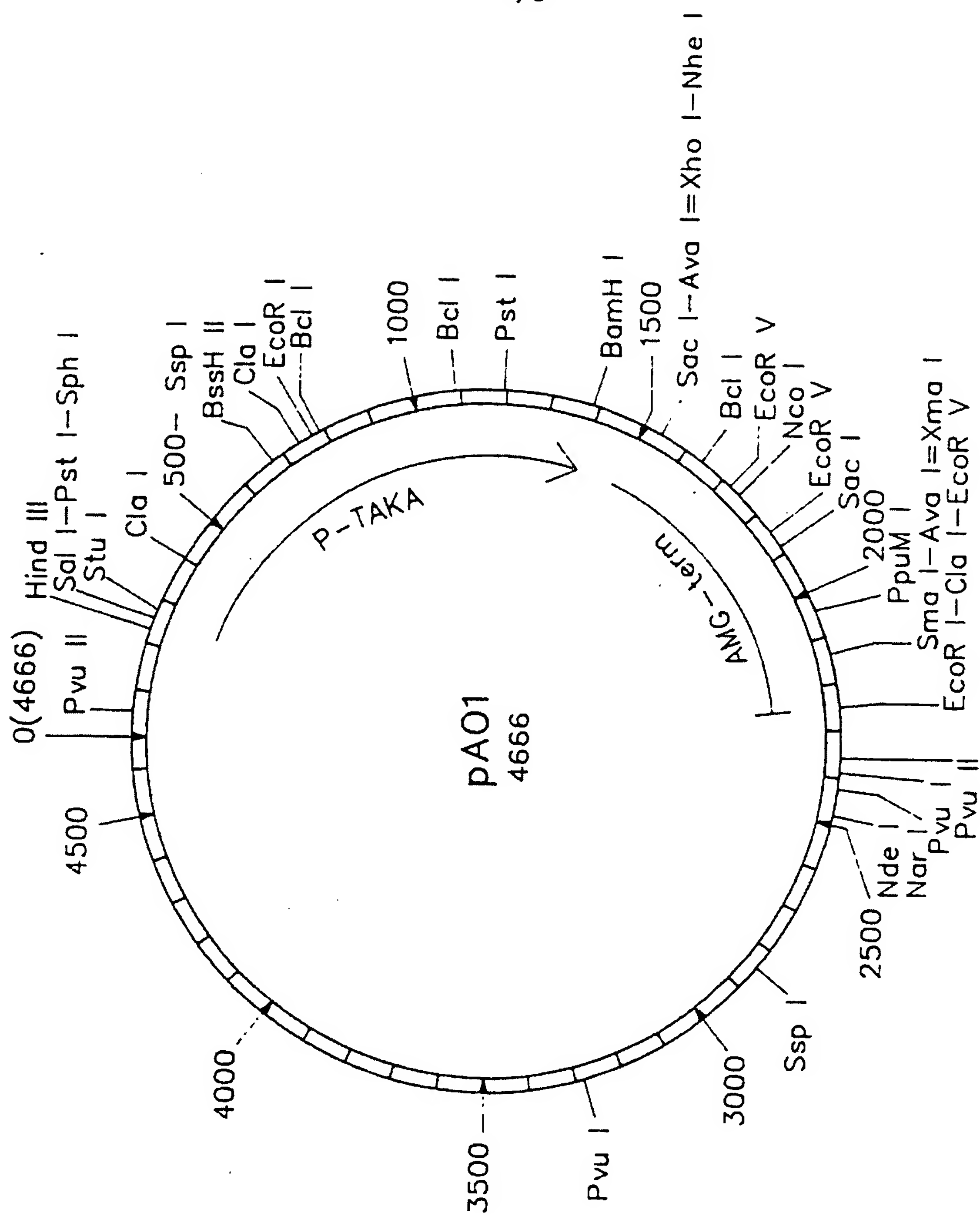




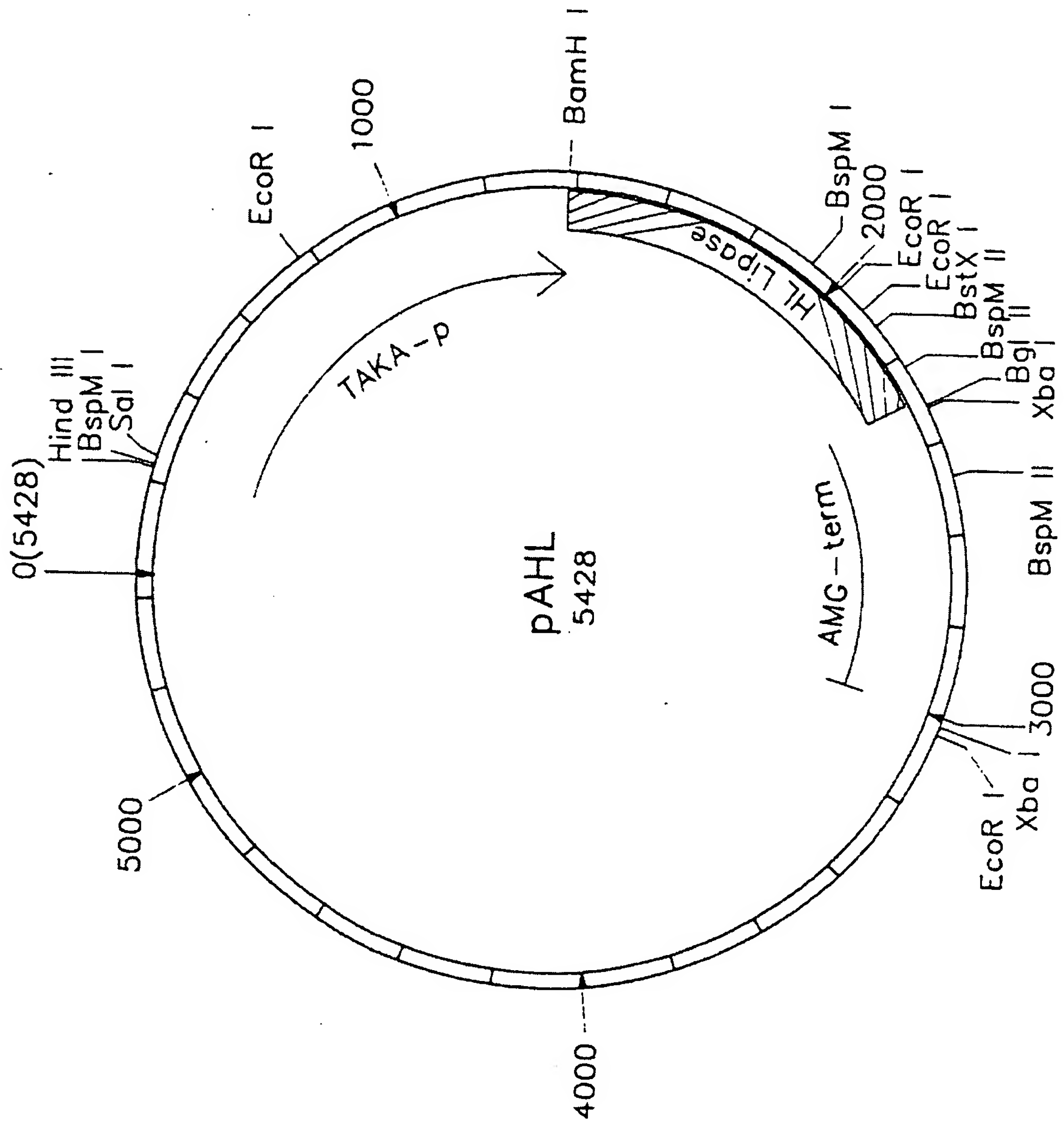
Εικ. 3



Εικ. 4



Ex. 5



**Fig. 6**

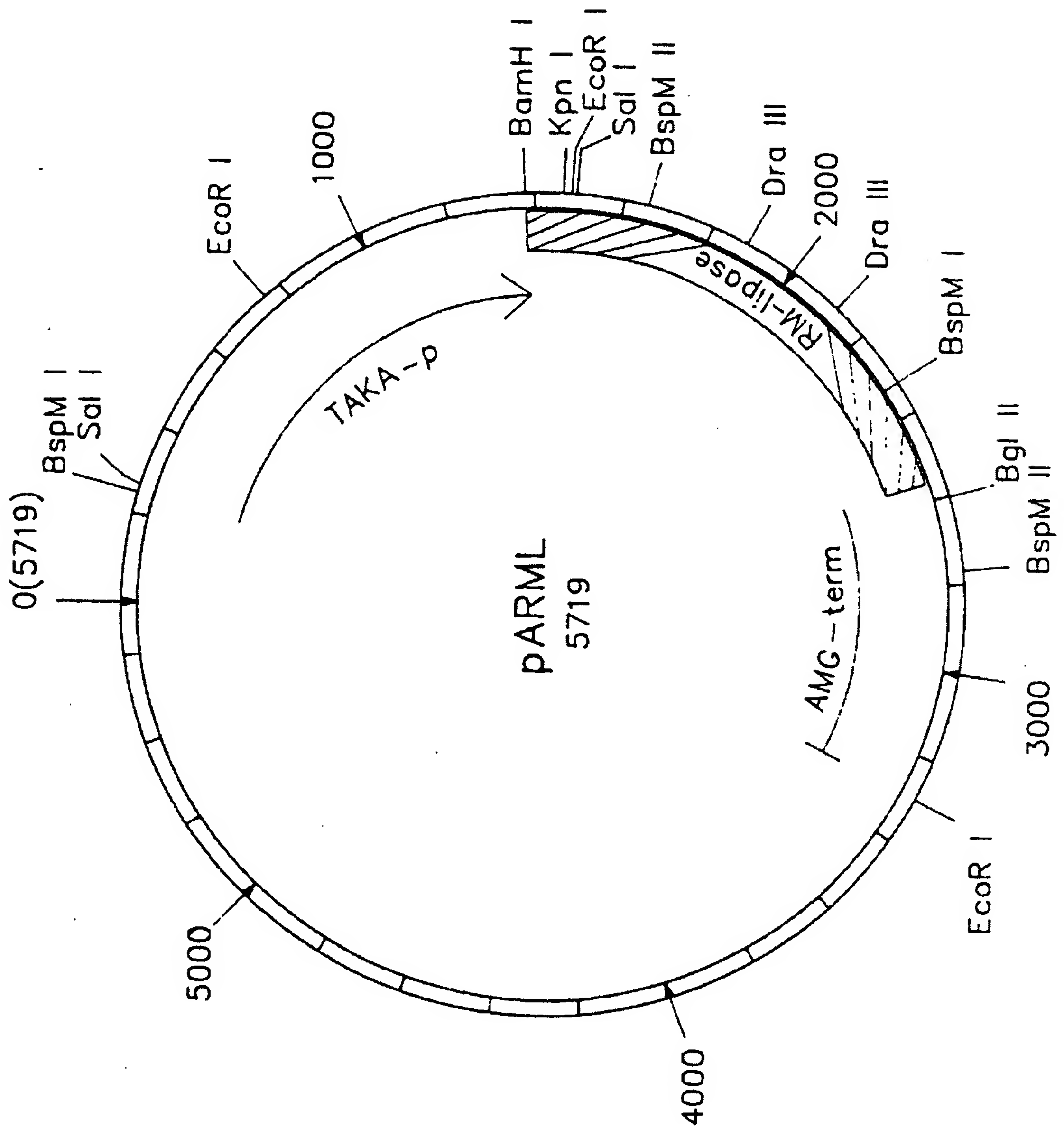


Fig. 7